

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Etude de l'implication du cuivre dans les mécanismes de la sénescence répllicative et induite prématurément par les stress chez les fibroblastes humains WI-38

Bonfitto, François

*Award date:*  
2009

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

## **Etude de l'implication du cuivre dans les mécanismes de sénescence cellulaire chez les fibroblastes humains WI-38**

BONFITTO François

### Résumé

Au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'implication du cuivre dans les mécanismes de sénescence chez les fibroblastes humains WI-38. Pour ce faire, nous avons tout d'abord mis au point un modèle d'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ . Ensuite nous avons montré une augmentation de l'expression de gènes connus pour être régulés par le cuivre (Hsp70, Prp, Hmox-1, MT2A) suite à l'exposition de ces fibroblastes au  $\text{CuSO}_4$ . Nous avons également montré une augmentation de l'abondance protéique de ceux-ci.

Nous avons aussi évalué les variations d'abondance relative en ARNm de ces mêmes gènes dans un modèle connu de sénescence induite prématurément par les stress ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Nous avons alors observé une augmentation marquée de l'ensemble de ces transcrits, confirmant notre hypothèse selon laquelle les gènes régulés par le cuivre peuvent être surexprimés dans des conditions de sénescence cellulaire induite prématurément par un stress.

Suite à cela, nous avons étudié l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ . Nous avons observé une morphologie cellulaire typique, une augmentation marquée de cellules montrant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'expression de gènes caractéristiques de la sénescence cellulaire.

Enfin, afin de comprendre les causes potentielles de l'apparition de ces biomarqueurs de la sénescence, nous avons mis en évidence de manière indirecte la présence de stress oxydatifs et de dommages à l'ADN, après exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ .

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2009

Promoteur: O. Toussaint

## Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ADP : Adénosine diphosphate  
AP-1 : Activator Protein-1  
ApoJ : Apolipoprotéine J  
ARN : Acide Ribonucléique  
ARNm : ARN messenger  
ATF-2 : Activating Transcription Factor 2  
ATP : Adénosine Triphosphate  
ATP7A : ATPase 7A  
ATP7B : ATPase 7B  
Atx1/Atox1 : Antioxydant 1  
BME : Basal Medium Eagle  
BSA : Bovine Serum Albumin  
CDK : Cyclin-Dependent Kinase  
CDKI : Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor  
CCO : Cytochrome C Oxydase  
CCS : Copper Chaperone for SOD  
CHSE : Chinook Salmon Embryo  
CO<sub>2</sub> : Dioxyde de carbone  
Cox17 : Cytochrome C Oxydase 17  
Ct : Cycle Threshold  
CTGF : Connective Tissue Growth Factor  
Ctr1 : Copper transporter 1  
Ctr1<sup>-/-</sup> : souris KO pour Ctr1  
Cu : Cuivre  
CuCl<sub>2</sub> : Chlorure de cuivre  
CuSO<sub>4</sub> : Sulfate de cuivre  
Cu-Zn SOD : Cu-Zn Superoxyde Dismutase  
D.O. : Densité Optique  
ECL : Enhanced Chemiluminescent  
EGFP : Enhanced Green Fluorescent Protein



EtOH : Ethanol  
FBS : Fetal Bovine Serum  
G0 : Growth 0  
G1 : Growth 1  
G2 : Growth 2  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Peroxyde d'hydrogène  
H2AX : Histone 2AX  
Hmox-1 : Hème Oxygénase-1  
HSF 1 : Heat Shock Factor 1  
Hsp70 : Heat Shock protein 70  
IGF 1 : Insulin like Growth Factor 1  
IGF 2 : Insulin like Growth Factor 2  
IGFBP : Insulin-like Growth Factor Binding Protein  
kDa : Kilo Dalton  
kb : Kilo base  
KO : Knock-Out  
M : Mitosis  
mA : Milli Ampère  
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase  
MCJ : Maladie de Creutzfeldt-Jacob  
Mnk : Menkes protein  
MT2A : Metallothionein 2A  
P-H2AX : Phospho-H2AX  
PBS : Phosphate buffer saline  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PFA : Paraformaldéhyde  
PIB : Phosphatase Inhibitor Buffer  
PIC : Phosphatase Inhibitor Cocktail  
PrP : Prion protein  
PVDF : Polyvinylidène Difluoride  
Rb ou pRb: protéine du rétinoblastome  
RNAi : ARN interférant  
RNase : Ribonucléase  
ROS : Reactive Oxygen Species



rpm : rotation par minute  
RT : Room Temperature  
RT-PCR : Reverse Transcriptase PCR  
S : Synthesis  
SA  $\beta$ -gal : Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase  
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate  
SIPS : Sénescence Induite Prématûrément par les Stress  
SOD : Superoxyde Dismutase  
SR : Sénescence Réplicative  
SRE : Serum Response Element  
SRF : Serum Responsive Factor  
*t*-BHP : *tert*-butylhydroperoxyde  
TBS : Tris-Buffered Saline  
TBS-T : Tris-Buffered Saline Tween  
TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine  
TGF $\beta$ -1 : Transforming Growth Factor  $\beta$ -1  
TRF-1 : Telomeric Repeat binding Factor-1  
TRF-2 : Telomeric Repeat binding Factor-2  
UV : Ultraviolets  
UVA : Ultraviolets de type A  
UVB : Ultraviolets de type B  
Zn : Zinc

# Introduction

## Partie 1 : Mécanismes de la sénescence répllicative et de la sénescence induite prématurément par les stress

### 1. Sénescence Répllicative

En 1961, Hayflick et Moorhead ont montré *in vitro*, qu'une population de fibroblastes de poumon fœtal humain mis en culture avait une capacité proliférative limitée à une cinquantaine de passage en culture. Cette observation a été interprétée comme étant le vieillissement cellulaire (HAYFLICK and MOORHEAD, 1961). En effet, les cellules qui ont atteint la limite de leur potentiel prolifératif, arrêtent de se diviser de manière irréversible, tout en restant métaboliquement active.

Il a également été établi que l'évolution des cultures pouvait se diviser en 3 phases (**Figure I.1**) (Shay and Wright, 2000). La phase I se situe entre la mise en culture de l'explant de tissu et l'établissement de culture primaire. La phase II correspond à une phase de croissance exponentielle des cellules, et la phase III représente, quant à elle, un rythme de division beaucoup plus lent jusqu'à l'apparition d'un arrêt définitif des divisions cellulaires, nommé sénescence répllicative.

La limite de Hayflick, ou la sénescence répllicative (SR), a ensuite été élargie à d'autres types cellulaires prolifératifs et à d'autres espèces animales, de telle sorte qu'il est actuellement accepté comme modèle général du vieillissement *in vitro* des cellules à potentiel prolifératif limité (Hayflick, 1961).

Les premières études sont parvenues à démontrer une relation inverse entre le nombre de passages en culture des cellules issues d'un prélèvement tissulaire par exemple, et l'âge du donneur (Martin *et al.*, 1998). Cependant d'autres études ont plus tard révélé que des fibroblastes de centenaires étaient capables de proliférer aussi longtemps que des cellules issues d'individus plus jeunes (Tesco *et al.*, 1998).

### 2. Sénescence Induite Prématurément par les stress (SIPS)

*In vitro*, de nombreux types cellulaires ayant été soumis à un ou plusieurs stress sublétaux présentent un phénotype semblable aux cellules en SR et appelé sénescence induite prématurément par les stress ou SIPS (Toussaint *et al.*, 2002).

Un stress peut être défini comme toute perturbation défavorable d'un facteur environnemental auquel est exposé un système vivant. Lorsque l'on soumet des cellules à des concentrations sublétales de *tert*-butylhydroperoxyde (*t*-BHP) (Toussaint *et al.*, 1992), de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fripiat *et al.*, 2001b) (Chan and Ward, 1993), d'éthanol (Dierick *et al.*, 2002) etc, ou à des doses sublétales de rayons ultraviolets (UV) (Debaq-Chainiaux *et al.*, 2005), on observe l'apparition de biomarqueurs de la sénescence.



### 3. Les biomarqueurs de la sénescence

#### 3.1. Modification histochimique : activité $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence (SA $\beta$ -gal)

En 1995, Judith Campisi et son équipe ont découvert que l'enzyme  $\beta$ -galactosidase montrait une activité anormale dans les cellules sénescents (Dimri *et al.*, 1995). Cette activité fut dès lors appelée « senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA  $\beta$ -gal) activity ». La  $\beta$ -galactosidase, une enzyme de type hydrosylase lysosomiale clivant le lactose en glucose et en galactose, possède une activité optimale à un pH 4. La SA  $\beta$ -galactosidase possède un pic d'activité qui se situe à un pH de 6. Ceci a été démontré expérimentalement à un pH de 6, où des cellules sénescents mises en présence de X-gal, substrat artificiel de la SA  $\beta$ -galactosidase, se colorent en bleu (**Figure I.2**). Plus les cellules sont âgées, plus le pourcentage des cellules montrant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence augmente, tant *in vitro* que *in vivo*.

Une augmentation de la proportion de cellules montrant cette activité a également été démontrée chez des fibroblastes humains après que ces derniers aient été soumis à l' $H_2O_2$  (Fripiat *et al.*, 2001b), le *t*-BHP (Dumont *et al.*, 2000), à l'éthanol (EtOH) (Pascal *et al.*, 2005) ou les UVB (Chainiaux *et al.*, 2002).

Dans la littérature, l'hypothèse la plus couramment avancée expliquant la détection de cette activité enzymatique tient en compte l'augmentation en taille et en nombre des lysosomes dans les cellules sénescents, ainsi qu'une augmentation de la quantité de lipofuscine et d'autophagosomes. L'augmentation de la quantité d'autophagosomes serait due à une augmentation de l'autophagie durant le vieillissement *in vitro* (Gerland *et al.*, 2003). Cette activité enzymatique apparaît alors être le résultat de l'augmentation de l'activité lysosomale à un pH sub-optimal, qui devient dès lors détectable dans les cellules sénescents (Kurz *et al.*, 2000). L'équipe de Lee a également mis en évidence dans des cellules sénescents, une surexpression du gène de la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du facteur de transcription ATF-2 activé par  $p38^{MAPK}$  (Lee *et al.*, 2006).

Enfin, cette activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence a été montrée dans différents types cellulaires, incluant les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules épithéliales mammaires (Dimri *et al.*, 1995).

#### 3.2. Altération de l'ADN mitochondrial

La mitochondrie est le seul organe subcellulaire qui possède son propre génome chez les cellules animales. L'ADN mitochondrial est de type circulaire, double brin et multicopie. Il est composé de 16.569 paires de bases et comporte, chez l'être humain, 37 gènes codant pour 22 ARN de transfert, 2 ARN ribosomiaux et 13 protéines dont une partie est impliquée dans la respiration mitochondriale et la réplication de l'ADN mitochondrial (Passarella *et al.*, 2008).

La respiration mitochondriale des radicaux libres dérivés de l'oxygène, ou ROS. Ces ROS endommagent l'ADN mitochondrial (Filser *et al.*, 1997). Il en résulte de nombreuses



mutations, duplications, délétions et dommages oxydatifs aux bases de l'ADN mitochondrial. Ces processus sont d'autant plus accentués au cours du vieillissement cellulaire.

Un des dommages de l'ADN mitochondrial identifié est la délétion 4,977 bp, ou délétion commune, que l'on retrouve tant en sénescence répliquative qu'en SIPS (Dumont *et al.*, 2000; Meissner *et al.*, 2001). Il a été démontré, *in vivo*, que la fréquence de cette délétion augmente avec l'âge et engendre un dysfonctionnement du métabolisme énergétique au niveau de la peau, des poumons, du cœur, des reins et des muscles squelettiques (Pang *et al.*, 1994; Fahn *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998). Ceci est d'autant plus vrai pour les tissus exposés à la lumière et dans les tissus qui consomment le plus d'oxygène et qui génèrent donc plus de radicaux libres tels le foie et le cerveau (Pang *et al.*, 1994).

### 3.3. Raccourcissement des télomères

Les télomères constituent des régions hautement répétitives de 6 à 15 paires de bases et non codantes d'ADN à l'extrémité des chromosomes (Blackburn, 1994). Chez les vertébrés, cette séquence est constituée par les nucléotides TTAGGG, sur une longueur de 3 à 20 kb (Meyne *et al.*, 1989).

Ces séquences répétitives d'ADN sont associées à différentes protéines, dont TRF1 (Chong *et al.*, 1995), TRF2 (Broccoli *et al.*, 1992) et A1/UP1 (Dallaire *et al.*, 2000) qui assurent une protection des terminaisons chromosomiques. Les télomères ont pour rôle d'empêcher que le chromosome s'effiloche et que son extrémité ne soit considérée comme une rupture du double brin d'ADN, ce qui pourrait conduire à des soudures de chromosomes par fusion de leur télomère respectif. Les télomères permettent donc de protéger les extrémités des chromosomes de cassures double brins et de leur dégradation par des enzymes de type exonucléases (Bourgain and Katinka, 1991).

Chez la majorité des eucaryotes multi-cellulaires, les télomères ont une longueur originale de 10 à 15 kb. Cette longueur diminue au cours de la vie lors des divisions cellulaires chez les cellules somatiques humaines. Certaines théories expliquent que le raccourcissement progressif des télomères des cellules somatiques, évalué entre 15 et 50 pb/an *in vivo* (Allsopp *et al.*, 1992) s'avérerait être une cause possible de la sénescence et préviendrait le cancer.

Cette réduction de la longueur télomérique est liée au problème de «fin de répllication». En effet, le raccourcissement des télomères est expliqué par la manière dont les nouveaux brins complémentaires à l'ADN sont synthétisés par les polymérases. Ces enzymes synthétisent l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' uniquement. Les deux brins d'ADN sont donc répliqués par des mécanismes différents, l'un étant copié de manière ininterrompue alors que l'autre est copié de façon discontinue. La répllication discontinue utilise des amorces ARN pour la synthèse de courts segments d'ADN qu'on appelle les fragments d'Okazaki. Ces fragments d'Okazaki, une fois que l'ADN a été répliqué, sont détruits et remplacés par de l'ADN. La perte d'information lors de la synthèse discontinue provient donc du fait que l'amorce d'ARN du dernier fragment d'Okazaki est dégradée sans être remplacée (**Figure I.3**).

Quand le télomère devient trop court, il ne joue plus son rôle protecteur. La cellule va interpréter ceci comme un dommage de son ADN, stopper sa prolifération et entrer en sénescence. De ce phénomène découle la théorie télomérique du vieillissement, où la



sénescence cellulaire serait définie par la taille des télomères (Allsopp *et al.*, 1992). En effet, ces derniers semblent constituer l'horloge interne de la cellule en définissant le nombre de mitoses effectuées au cours du temps.

### 3.4. Régulation du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes comprend 4 phases distinctes :

- La phase G1 est la phase pendant laquelle la cellule intègre les signaux mitogènes ou anti-mitogènes et se prépare pour effectuer correctement la phase S. Le passage de la phase G1 à la phase S se fait après le point de restriction R, véritable contrôle de l'état cellulaire avant la phase de duplication de l'ADN, qui détermine si toutes les conditions sont remplies pour entamer une nouvelle division (abondance de milieu nutritif, importance des dommages à l'ADN, etc).
- La phase S ou phase de synthèse, correspond à la duplication du matériel génétique.
- La phase G2 représente la phase pendant laquelle des mécanismes de division cellulaire, dont le fuseau mitotique mais également la fabrication de protéines nécessaires à la division.
- La phase M ou phase de mitose, correspond à la phase de partage égal des chromosomes entre les deux cellules filles.

Lors du cycle cellulaire, ces quatre phases se succèdent dans l'ordre suivant: G1, S, G2 et M. Les trois premières phases (G1, S, G2) constituent l'interphase, durant laquelle le noyau de la cellule est limité par une enveloppe nucléaire, alors que la phase M de mitose est caractérisée par la disparition de cette enveloppe et par l'apparition des chromosomes. Après la mitose, les cellules peuvent soit passer en G1, soit entrer en G0, stade quiescent de non division. Les cellules en phase G0 peuvent recommencer un cycle cellulaire et entrer en phase G1 suite à leur stimulation par des facteurs mitogènes (Pardee, 1974).

Une des caractéristiques de la cellule sénescence est son incapacité à passer de la phase G1 à la phase S. Cette incapacité provient d'un blocage au niveau du point de restriction et donc d'une impossibilité de passer en phase S. Plusieurs gènes sont connus pour jouer un rôle déterminant dans cet arrêt d'état de prolifération. Ces gènes peuvent être répertoriés sous 4 catégories, à savoir les gènes de réponse précoce, les gènes impliqués dans la transition G1/S, les complexes cyclines/CDK et enfin les inhibiteurs de complexes cyclines/CDK (Csikasz-Nagy *et al.*, 2008) (**Figure I.4**).

#### 3.4.1. Les gènes de réponse précoce

Les gènes de réponse précoce sont induits par l'addition de facteurs de croissance ou de mitogènes afin de permettre la prolifération cellulaire. La grande majorité de ces gènes précoces codent pour des facteurs de transcription tels c-Fos et c-Jun, qui transactivent les gènes de réponse tardive.



Chez les cellules non sénescents, les mitogènes activent la transduction du gène *c-myc*. *C-myc* active l'expression de la protéine SRF (Serum Responsive Factor) capable de se lier à la séquence consensus de SRE (Serum Response Element). SRE va permettre la transcription de *c-fos*. Lorsque *c-Fos* est traduite, elle dimérise alors avec *c-Jun*. La dimérisation entre ces deux protéines, *c-Fos* et *c-Jun*, par l'intermédiaire d'une liaison de type « fermeture éclair » constituée de leucine, forme le complexe transcriptionnel AP-1. Ce dernier permet la transcription de gènes essentiels au passage de la phase G1 à la phase S. Chez les cellules sénescents, il a été démontré que *c-Fos* n'était plus exprimé par une stimulation par des agents mitogènes, rendant donc impossible le passage de la cellule en phase S. Le manque d'expression de *c-Fos* dans les cellules en sénescence provient de l'hyperphosphorylation de SRF, alors incapable de lier le SRE et donc d'induire la transcription du gène *c-fos* (Atadja *et al.*, 1994) (**Figure I.5**).

#### 3.4.2. Les gènes de la phase G1/S

La répression des gènes normalement exprimés lors du passage de la phase G1 à la phase S est induite par une déficience en E2F. E2F est un hétérodimère formé d'un membre de la famille E2F (E2F-1/6) (Cartwright *et al.*, 1998) et d'un membre de la famille DP (DP1 ou DP2). Le facteur de transcription E2F est séquestré par la protéine du rétinoblastome (pRb) sous sa forme active (hypophosphorylée). Sa phosphorylation en fin de phase G1 permet la libération de E2F, qui va alors activer la transcription de gènes essentiels à l'entrée en phase S. Ensuite E2F est phosphorylé par le complexe cycline A/CDK2 activé durant la phase S (Kitagawa *et al.*, 1995). E2F perd alors son affinité pour l'ADN et par conséquent son activité de facteur de transcription. La déficience en E2F lors de la sénescence est induite par une hypophosphorylation de la protéine Rb, empêchant donc la libération du facteur de transcription E2F (**Figure I.6**). Il est donc aisé de comprendre le rôle fondamental de la protéine Rb en tant que suppresseur de tumeurs et en tant qu'inhibiteur important du cycle cellulaire.

#### 3.4.3. Les CDK/cyclines

La progression du cycle cellulaire est régulée de manière étroite par les kinases dépendantes de cycline, ou CDK. Les CDK constituent une famille de protéines constituées d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. Les CDK forment des complexes avec différentes cyclines, ces dernières jouant un rôle de régulation des CDK. L'expression et l'activation de ces complexes cycline/CDK est séquentielle et diffère selon la phase du cycle dans laquelle se situe la cellule (Simmons Kovacs *et al.*, 2008).

La transition entre la phase G1 et la phase S, ou point de restriction, est régulée par les complexes cyclines D/CDK4 et D/CDK6. Ces deux complexes sont activés suite à leur stimulation par un mitogène, et permettent l'entrée en phase S. Le complexe D/CDK4 active la liaison de la cycline E à la CDK2 pour la cellule en phase G1. Le rôle du complexe cycline E/CDK2 est de phosphoryler la protéine du rétinoblastome ou pRb, protéine qui possède un domaine « pocket » capable de séquestrer le facteur de transcription E2F. E2F, une fois libéré, induit la synthèse des gènes nécessaires à la division. Cet événement est caractéristique et définit le passage du point de restriction de la phase G1. La cycline E est dégradée au début de la phase S, après l'initiation de la réplication, et est remplacée progressivement dans le complexe par la cycline A. Les complexes cycline A/CDK2 sont nécessaires à la



phosphorylation de protéines aux origines de la réplication de l'ADN jusqu'à la fin de la phase S.

#### 3.4.4. Les inhibiteurs des complexes cycline/CDK

L'activité des complexes cycline/CDK est inhibée par une série de protéines de faible poids moléculaire. Ces protéines inhibitrices de la croissance cellulaire sont classées en deux familles d'inhibiteurs (CKI) :

La famille Ink4 regroupant quatre protéines  $p16^{INK4a}$ ,  $p15^{INK4b}$ ,  $p18^{INK4c}$  et  $p19^{INK4d}$  liant et inhibant l'activité kinase des complexes contenant CDK4 et CDK6. La famille des INK exerce leur action inhibitrice soit en dissociant les complexes cycline/CDK soit en empêchant leur formation. La protéine  $p16^{INK4a}$ , inhibe l'association des cyclines D avec la CDK 4 et la CDK6. Cette inhibition a pour conséquence d'empêcher la phosphorylation de la protéine Rb, conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Il a été montré que la protéine  $p16^{INK4a}$  est surexprimée dans des fibroblastes humains en sénescence, mais également, et tout comme  $p15^{INK4b}$ , au niveau de lymphocytes T humains en sénescence (Erickson *et al.*, 1998; Weebadda *et al.*, 2005).

La seconde famille d'inhibiteurs de complexes cycline/CDK est constituée par la famille Cip/Kip. Cette famille, constituée par les protéines  $p21^{Waf-1}$ ,  $p27^{kip1}$  et  $p57^{Kip2}$  inhibe l'activité de tous les complexes cycline-CDK présents en phase G1 (Sherr and Roberts, 1999). La protéine la plus intéressante de cette famille est sans doute  $p21^{Waf-1}$ . En effet, la transcription du gène de  $p21^{Waf-1}$  est activée par p53 suite à des dommages à l'ADN et régule donc l'arrêt de la mitose induit par p53.

La protéine p53 est centrale dans la protection de la cellule contre la croissance tumorale de part ses deux rôles particuliers dans l'arrêt du cycle cellulaire entre la phase G1 et la phase S et dans la mort cellulaire par un phénomène d'apoptose. La protéine p53 se lie avec une séquence spécifique d'ADN aboutissant à une interaction avec le cycle cellulaire par l'intermédiaire d'un gène appelé WAF1/Cip1, dont la protéine  $p21^{Waf-1}$  se lie aux kinases CDK2, et en inhibe l'activité. Si le signal activant la p53 persiste, la production continue de  $p21^{Waf-1}$  entraîne donc un état de sénescence cellulaire. On observe en effet, chez les cellules en pré-sénescence, une expression de  $p21^{Waf-1}$  de 10 à 20 fois plus élevée par rapport à de jeunes cellules. Une fois la sénescence clairement installée, l'expression de  $p21^{Waf-1}$  diminue de manière concomitante avec l'augmentation de l'expression de  $p16^{INK4a}$ .

#### 3.5. Expression de gènes associés à la sénescence

Dès 1998, une étude a mis en évidence plus de 80 gènes dont le niveau d'expression génique varie au cours du vieillissement *in vitro* des fibroblastes humains (Cristofalo and Tresini, 1998). Ces gènes sont très divers et codent pour des facteurs de croissance, des inhibiteurs de croissance, des récepteurs de la matrice extracellulaire ou encore des régulateurs du cycle cellulaire.

Au même moment, l'équipe de Gonos a démontré que la fibronectine, l'ostéonectine et l'apolipoprotéine J (ApoJ) étaient aussi exprimés de manière différentielle en sénescence



répliquative (Gonos *et al.*, 1998). Plus tard, l'équipe de Pascal a montré que le Connective Tissue Growth Factor (CTGF), l'Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3 (IGFBP3) ou encore le Transforming Growth factor beta-1 (TGF $\beta$ -1) étaient aussi exprimés de manière différentielle en sénescence répliquative (Pascal *et al.*, 2005).

Ces gènes sont aussi, pour la plupart, surexprimés chez des fibroblastes en sénescence induite prématurément par des expositions au *t*-BHP (Pascal *et al.*, 2005), à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Dumont *et al.*, 2000), à l'EtOH (Pascal *et al.*, 2005) ou aux UVB (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005). Lors de ce travail, nous nous sommes particulièrement focalisés sur l'expression des gènes associés à la sénescence suivants :

- *ApoJ*

L'apolipoprotéine J est une glycoprotéine de 70-80 kDa synthétisée de manière constitutive par de nombreux types cellulaires dans de nombreux processus physiologiques tels l'embryogenèse et la différenciation cellulaire (Zakeri *et al.*, 1992; de Silva *et al.*, 1990). Cette protéine lie le facteur de transcription HSF 1 (Heat Shock Factor 1) et empêche l'altération radicalaire des protéines (Michel *et al.*, 1997). De nombreuses études ont montré qu'une surexpression de l'ApoJ protège la cellule de l'apoptose dans de nombreuses lignées cellulaires, incluant PC3 (Sintich *et al.*, 1999), LNCaP (Sintich *et al.*, 1999; Sensibar *et al.*, 1995) et L929 (Humphreys *et al.*, 1997). L'ApoJ peut être induite par de nombreux stress et sa surexpression peut être associée à la survie cellulaire lors de la sénescence et à la suite d'un stress oxydatif (French *et al.*, 1994). Cette protéine est également surexprimée dans les stades tardifs de la maladie d'Alzheimer (Schachter *et al.*, 1994).

- *CTGF*

Le CTGF est une protéine riche en cystéine qui lie l'héparine. Le CTGF (ou IGFBP8) active la croissance cellulaire, le chimiotactisme, l'adhésion et la survie cellulaire (Brigstock, 1999). Il s'agit d'un effecteur de l'effet fibrotique du TGF $\beta$ , et est donc un puissant mitogène pour les fibroblastes et des cellules musculaires lisses (Lohr *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2000). Une surexpression de CTGF a été démontrée dans des cellules hépatocytaires de rat en sénescence et dans les fibroblastes diploïdes humains IMR-90 (Kim *et al.*, 2004).

- *IGFBP3*

IGFBP3 est un membre de la famille protéique qui régule l'activité d'IGF1 et d'IGF2. Une accumulation d'IGFBP3 a été récemment montrée dans le milieu de culture de fibroblastes humains sénescents, suggérant une contribution de l'IGFBP3 dans ce phénotype. La surexpression d'IGFBP3 augmente également l'apoptose de cellules tumorales du fait de sa capacité à cibler les régulateurs intracellulaires d'apoptose tels les facteurs de transcription nucléaires (Hampel *et al.*, 2005).

- *TGF $\beta$ -1*

Le TGF $\beta$ -1 fait partie de la superfamille des cytokines TGF (Transforming Growth Factor). Il s'agit d'une protéine sécrétée qui est au centre de multiples fonctions cellulaires telles la croissance, la prolifération, la différenciation et l'apoptose. La transduction du signal de TGF- $\beta$ 1 se déroule via son interaction avec des récepteurs membranaires hétérodimériques. Ces hétérodimères sont constitués de deux récepteurs sérine/thréonine kinases, connus sous le



nom de récepteur de type I et récepteur de type II. La liaison de TGFβ-1 se déroule de manière spécifique au niveau du récepteur de type II, une kinase constitutive, et engendre le recrutement et l'activation du récepteur de type I.

Une fois activé par son ligand TGFβ-1, l'hétérodimère s'associe avec la protéine Smad4 qui, une fois activée, va subir une translocation vers le noyau. Smad4 activé va alors interagir au niveau du noyau avec différentes séquences d'ADN, ayant pour conséquence finale la régulation de l'expression de certains gènes (Massague and Wotton, 2000).

Outre son importance dans la régulation de l'expression génique, le TGFβ-1 joue un rôle dans l'apparition de plusieurs marqueurs de la sénescence cellulaire, après exposition à des stress sublétaux (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UVB, t-BHP, éthanol, etc) tels les changements de morphologie, l'augmentation des cellules présentant une activité β-galactosidase associé à la sénescence et une augmentation de l'abondance des gènes associés à la sénescence (Fripiat *et al.*, 2001b).

De manière plus précise, il a été démontré que la phosphorylation de la protéine p38<sup>MAPK</sup> est responsable de la surexpression de TGFβ-1, induite par un stress à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et, de manière conséquente, de l'apparition des biomarqueurs de sénescences induits par TGFβ-1. La protéine p38<sup>MAPK</sup> joue un rôle dans la phosphorylation du facteur de transcription ATF-2. Le facteur de transcription ATF-2 reconnaît le promoteur de TGFβ-1. Le TGFβ-1 alors transcrit et traduit interagit alors avec son récepteur hétérodimérique, engendrant ainsi une deuxième vague d'activation de p38<sup>MAPK</sup>. Ce système de régulation engendre donc une surexpression de TGFβ-1 (Fripiat *et al.*, 2002).



## Partie 2 : Cuivre et vieillissement cellulaire

### 1. Cuivre : Généralités

Le cuivre est un élément essentiel jouant un rôle critique dans la biochimie de tous les organismes aérobies (Culotta *et al.*, 1999). Il permet notamment le transfert d'électrons via des cuproenzymes spécifiques dans des voies métaboliques critiques. De part son rôle de coordination avec des ligands chimiques, le cuivre est central dans certains changements de structures protéiques, d'activités catalytiques et d'interactions protéines-protéines. Il est dès lors impliqué dans une étonnante variété de mécanismes biochimiques et régulatoires tels la respiration cellulaire, la formation de pigments, la biosynthèse de neurotransmetteurs ou encore la défense antioxydante (Pena *et al.*, 1999).

Le cuivre existe sous forme ionique dans deux états d'oxydation : le cuivre réduit ( $\text{Cu}^+$ ) et le cuivre oxydé ( $\text{Cu}^{++}$ ). Le rôle critique du cuivre au sein de la biochimie de l'organisme est la conséquence de l'activité rédox importante de ces deux formes ioniques. En effet, la facilité relative avec laquelle le cuivre peut être converti dans ces états d'oxydation a été largement exploité par les organismes et a conduit à son utilisation comme cofacteur catalytique pour une variété de métalloenzymes impliquées dans de nombreux et divers processus biologiques. Le cuivre fonctionne dès lors comme un cofacteur structural et catalytique d'une variété importante d'enzymes telles la cytochrome C oxydase, la tyrosinase, la Cu-Zn superoxydase dismutase (SOD), centrales dans la croissance, le développement et la maintenance de l'organisme (Turnlund *et al.*, 1999; Uauy *et al.*, 1998).

Cependant, et bien que le cuivre soit essentiel au maintien de l'organisme, il catalyse également la production d'espèces hautement réactive à l'oxygène (ROS), conduisant à des dommages oxydatifs des lipides, des protéines, de l'ADN et d'autres biomolécules (Halliwell and Gutteridge, 1984b). Afin de se protéger contre la toxicité du cuivre, la nature a développé une machinerie sophistiquée pour l'absorption, le stockage et le trafic de cet élément (Field *et al.*, 2002; Arnesano *et al.*, 2004; Puig and Thiele, 2002). Des déficiences dans ces processus de régulation engendrent des pathologies graves tels que le syndrome de Menkes, la maladie de Wilson et certaines maladies neurodégénératives incluant la maladie d'Alzheimer (Gitlin, 2003; Mercer, 2001; Waggoner *et al.*, 1999).

### 2. Métabolisme lié au cuivre

Chez la plupart des mammifères, l'incorporation de cuivre dépend de manière importante du régime alimentaire. En effet, les produits alimentaires constituent la source principale de cuivre disponible pour l'organisme. Environ 30 à 50 % du cuivre ingéré, pour la plupart sous forme  $\text{Cu}^{++}$ , est absorbé au niveau de l'intestin et une très faible quantité est absorbée au niveau de l'estomac. Le cuivre absorbé au niveau de l'intestin peut, en plus d'être transporté au niveau du système sanguin, être stocké dans les cellules hépatocytaires, sécrété dans le plasma ou encore excrété par la voie biliaire (**Figure II.1**) (Turnlund *et al.*, 1997; Harris, 1993).

Le cuivre est transportée dans la cellule au niveau de la membrane plasmique et est ensuite distribué au sein de la cellule pour son incorporation. Le transport du cuivre au sein



des cellules eucaryotiques se fait après la réduction du cuivre sous forme  $\text{Cu}^{++}$  en  $\text{Cu}^+$  par une metalloréductase via Ctrl, « Copper transporter 1 », (**Figure II.2**) qui est une protéine membranaire intégrale largement conservée de la levure à l'homme (Puig and Thiele, 2002; Nose *et al.*, 2006; Maryon *et al.*, 2007).

Ctrl est exprimé de manière ubiquiste dans les tissus des mammifères, avec cependant des niveaux d'expression plus élevés au niveau du foie et des reins, ce qui coïncide avec les plus hauts niveaux de cuivre au sein de l'organisme (Zhou and Gitschier, 1997; Lee *et al.*, 2000).

De nombreuses études ont démontré chez des souris « knock-out » pour Ctrl au niveau des hépatocytes, une déficience accrue en cuivre, soulignant le rôle crucial de Ctrl dans l'acquisition du cuivre intracellulaire (Lee *et al.*, 2001). Cependant, chez ces même souris Ctrl<sup>-/-</sup>, il reste une activité d'acquisition résiduelle de cuivre au sein des hépatocytes capable d'assurer un minimum de fonctions vitales dans les diverses voies métaboliques dont la respiration cellulaire. Ces études suggèrent donc que le transporteur de cuivre à haute affinité Ctrl, n'est pas l'unique acteur dans l'acquisition du cuivre intracellulaire (Tennant *et al.*, 2002).

Après avoir traversé la membrane plasmique, le cuivre est distribué au niveau des compartiments sécrétoires, des mitochondries et des enzymes cytosoliques via respectivement les protéines chaperones spécifiques du cuivre Atx1/Atox1, Cox17 et CCs (Valentine and Gralla, 1997; Askwith and Kaplan, 1998; Harrison *et al.*, 2000).

Atx1 est la métallochaperone la plus étudiée dans ce domaine et a été isolée originellement comme protéine antioxydante chez *Saccharomyces cerevisiae* (Lin and Culotta, 1995; Lin *et al.*, 1997). Peu de temps après sa découverte dans la levure, son homologue Atox1, exprimé chez les mammifères et les humains, fut découvert (Klomp *et al.*, 1997). Une fois le cuivre entré dans la cellule, il se lie au site de liaison du cuivre de Atox1 et interagit avec la famille ATPase transporteuse du cuivre, ATP7, afin de rendre le cuivre disponible au sein des sites de biosynthèse et de transfert des métaux. Atox1 est donc une chaperone qui se lie aux ATPase transporteuses du cuivre et qui est essentielle à la livraison du cuivre importé vers les voies sécrétoires du réseau trans-golgien (Gybina and Prohaska, 2003). Outre sa fonction de chaperone, il a été montré que la forte présence de Atox1 au sein de neurones protégeait ces cellules contre les stress oxydatifs (Kelner *et al.*, 2000).

Une étude récente suggère que Atx1, en plus de son rôle de métallo-chaperone, est capable d'agir comme facteur de transcription régulant la prolifération cellulaire modulée par le cuivre (Itoh *et al.*, 2008). En effet, le cuivre joue également un rôle fondamental dans la régulation de la prolifération cellulaire impliquée dans les mécanismes de croissance tumorale, dans l'athérosclérose ou encore, dans les maladies dégénératives au niveau des cellules neuronales. Les lésions hyper-prolifératives dans le cancer ou dans l'athérosclérose montrent une concentration beaucoup plus élevée en cuivre au niveau des noyaux cellulaires alors que, dans des tissus sains, le cuivre est présent de manière prépondérante au niveau du cytoplasme. (Sen *et al.*, 2002; Goodman *et al.*, 2004; Birkaya and Aletta, 2005).

La chaperone du cuivre Cox17 a également été découverte en premier lieu chez la levure comme étant une petite protéine de 8 kDa requise pour le fonctionnement de la cytochrome C oxydase (CCO) (Glerum *et al.*, 1996). Cette protéine requise pour l'assemblage de la CCO est localisée au niveau du cytosol et de l'espace intermembranaire mitochondrial,



est capable de lier jusqu'à quatre atomes de  $\text{Cu}^+$  (Abajian *et al.*, 2004; Arnesano *et al.*, 2005). La CCO est une protéine composée de 13 sous-unités distribuées dans la membrane mitochondriale interne, et deux de ses sous-unités jouent un rôle dans la liaison du cuivre. Le rôle de la cytochrome C oxydase est de catalyser l'étape finale de transfert d'électrons vers l'oxygène moléculaire au cours de la phosphorylation oxydative.

Enfin, une autre chaperone jouant un rôle déterminant dans le métabolisme lié au cuivre est la « Copper chaperone for SOD », CCS. Cette protéine, comme son nom l'indique, est requise pour la mise en disponibilité du cuivre à la « Cu-Zn superoxyde dismutase », Cu-Zn SOD (Culotta *et al.*, 1997). CCS est une homodimère constitué de 2 sous-unités et de 2 domaines fonctionnels. Le premier domaine, « Domain I », contient le site de liaison au cuivre, le second domaine, « Domain II », est fortement homologue de la SOD et forme, avec cette dernière, des hétérodimères qui facilitent le transport du cuivre (Field *et al.*, 2002; Culotta *et al.*, 1997).

Il faut cependant souligner qu'il reste à ce jour beaucoup de zones d'ombres concernant les mécanismes qui sont liés au métabolisme du cuivre. En effet, il a été démontré qu'il existe de nombreuses protéines qui interagissent de manière directe avec le cuivre, sans pour autant connaître leur fonction exacte au niveau de son métabolisme. Par exemple, l'équipe de Garrick a montré que la protéine DMT1, connu pour être un transporteur du fer (divalent metal transporter 1) est également capable de se lier avec une grande affinité au cuivre. Cependant le rôle exact de cette protéine vis-à-vis du cuivre est encore mal connu (Garrick *et al.*, 2003).

### 3. Propriétés antioxydantes et pro-oxydantes du cuivre

Le métabolisme oxydatif est un des moyens trouvé au cours de l'évolution par la plupart des organismes vivants pour générer de l'énergie. Outre le fait de générer de l'énergie, le métabolisme oxydatif engendre également des aspects négatifs et dommageables à la cellule par la création d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) ainsi que des dommages oxydatifs.

La Cu-Zn SOD est une métalloprotéine impliquée dans la protection des cellules contre des radicaux superoxyde générés durant le métabolisme aérobie. D'un point de vue structurel, la Cu-Zn SOD est active sous la forme d'un homodimère dans lequel chaque polypeptide contient un ion de cuivre et un ion de zinc. Par son activité de transformation des radicaux superoxydes en oxygène et en peroxyde d'hydrogène, la Cu-Zn SOD est donc une des enzymes de défense majeure protégeant les cellules contre les effets toxiques des radicaux superoxydes (Landis and Tower, 2005). Il est important de noter que le peroxyde d'hydrogène, bien qu'également toxique dans une moindre mesure, est dégradé par des catalases ou des peroxydases.

Les radicaux superoxydes ( $\text{O}_2^-$ ) sont formés au niveau de la mitochondrie et sont dérivés de la chaîne de transport des électrons. Leur capacité à capter des électrons des molécules avoisinantes rendent les radicaux superoxydes très nocifs pour la cellule car, à terme, il peut en résulter des dommages cellulaires au niveau des lipides, des protéines et de l'ADN (Inoue *et al.*, 2003).



Les systèmes anti-oxydants ne sont pas toujours efficaces à 100 %. Cette situation est accentuée en cas de stress oxydatif, où la génération de ROS augmente. La preuve en est que le processus de vieillissement ainsi que de nombreuses maladies liés au vieillissement sont causés, au moins en partie, par des dommages oxydatifs. Une étude récente a d'ailleurs suggéré que la protéine Cu-Zn SOD était directement liée à l'espérance de vie cellulaire. En effet, en réalisant un « Knock-down » de cette protéine par l'utilisation d'ARN interférant (RNAi) chez des fibroblastes humains, ces auteurs ont observé l'apparition d'une sénescence prématurée chez ces mêmes fibroblastes. Ceci souligne donc le rôle primordial de la protéine Cu-Zn SOD comme régulateur de l'espérance de vie et de la sénescence cellulaire (Blander *et al.*, 2003a; Lu and Finkel, 2008).

De manière plus spécifique, le cuivre est un métal à activité redox, qui est capable de catalyser la formation de radicaux hydroxyles via des réactions de type Haber-Weiss ou Fenton (Gutteridge, 1985; Shi and Dalal, 1992). La capacité du cuivre de passer d'un état stable oxydé à un état instable réduit est utilisée par des cuproenzymes, telles la SOD, impliquées dans les réactions redox. La transition entre l'état oxydé et réduit peut potentiellement générer des espèces réactives à l'oxygène tels les radicaux superoxydes et hydroxyles. Si ces espèces réactives à l'oxygène ne sont pas détoxifiées de manière efficace, il en résulte potentiellement des dommages des composants cellulaires. De plus, le cuivre est d'autant plus toxique à forte concentration qu'il peut également lier avec une haute affinité les résidus histidine, cystéine, méthionine des protéines, ce qui peut entraîner leur inactivation.

Le cuivre participe à la production de ROS sous sa forme libre, c'est-à-dire non liée de manière covalente. Chez l'être humain, la majorité du cuivre sanguin est lié de manière covalente à la Ceruloplasmine, alors qu'un faible pourcentage est considéré comme étant « libre », lié faiblement à l'albumine ou à d'autres molécules. Dans tous les types cellulaires, il existe une réserve considérable de cuivre libre, dont une partie est stockée grâce aux métallothionéines (Brewer, 2007).

Cependant, il est important de noter que le taux de dommages augmente graduellement au cours du vieillissement. L'activité redox extrêmement active du cuivre entraînant la génération de ROS est importante dans le processus de vieillissement et dans la pathogenèse de nombreuses maladies liées au vieillissement (Blander *et al.*, 2003b; Zatta *et al.*, 2008b).

Lorsque le cuivre est accumulé de façon excessive, il en devient d'autant plus toxique par son engagement dans des réactions chimiques redox aboutissant à la génération de radicaux hydroxyles (Halliwell and Gutteridge, 1984a). L'exposition à des concentrations toxiques de cuivre, produit une réponse de stress intracellulaire. La réponse au stress induit par le cuivre entraîne une transcription altérée de nombreux gènes responsables du maintien de l'homéostasie des métaux et de la protection contre les dommages des composants cellulaires (Zhu and Thiele, 1996). De plus, le cuivre peut s'avérer toxique en se liant directement aux groupements sulfhydryles des protéines, ce qui résulte, à terme, en une inactivation enzymatique ou une conformation altérée des protéines (Jeon *et al.*, 2000). Dès lors, un équilibre délicat doit être maintenu entre l'accumulation de taux suffisant de cuivre pour les diverses réactions biochimiques et l'augmentation du nombre d'ions de cuivre à des niveaux toxiques.

La Hème oxygénase-1 (Hmox-1) est une protéine connue pour être induite par le stress. L'oxydation du groupement hème de Hmox-1 génère de la biliverdine, aux propriétés



antioxydantes, du fer sous forme ferreuse ainsi que du monoxyde de carbone. L'expression de Hmox-1 est augmentée, *in vitro* et *in vivo*, en réponse à différents stimuli associés au stress oxydatif. Ceux-ci incluent notamment l'hypoxie, l'hyperoxie, les métaux lourds, les UV-A ainsi que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ryter *et al.*, 2002). Chez les fibroblastes WI-38, l'éthanol et le t-BHP (Pascal *et al.*, 2007) à concentration induisant la SIPS, entraîne également une surexpression de Hmox-1. Le fait que l'expression d'Hmox-1 augmente en réponse à des stimuli aussi divers et variés démontre le rôle central de cette protéine dans la cytoprotection contre le stress oxydatif (Ryter *et al.*, 2002). Bien que le rôle de protection cellulaire d'Hmox-1 contre le stress oxydatif ait été démontré dans différents modèles d'hypoxie, d'inflammation, d'ischémie et d'hyperoxie, le mécanisme d'action de Hmox-1 reste actuellement peu compris, mais semble impliquer ses produits de réactions enzymatiques (Slebos *et al.*, 2003).

D'autres protéines comme la Heat shock protein 70 (Hsp70) ou encore la Métallothionéine-2A (MT2A) jouent également un rôle clé dans la protection contre la toxicité des métaux, dont le cuivre.

La protéine chaperone Hsp70 est la protéine la mieux conservée au cours de l'évolution (Lindquist and Craig, 1988; Gupta *et al.*, 1994). Elle est exprimée dans la majorité des organismes, de l'archéobactérie à l'être humain, en passant par le règne végétal. Hsp70 joue un rôle important dans le réassemblage de protéines ribosomales endommagées ainsi que dans la protection contre les stress induisant la dénaturation de certaines protéines.

En effet, il a été montré que, lorsque des cellules animales étaient exposées à des stress environnementaux et physiologiques tels la présence de métaux, la chaleur, des agents viraux et des ROS, l'expression de Hsp70 était induite et engendrait des mécanismes de protection et de réparation cellulaire en réponse à ces différents stress (Beckmann *et al.*, 1990; Parsell and Lindquist, 1993).

MT2A, quant à elle, appartient à la famille des métallothionéines. Cette famille de petites protéines (6-7 kDa) est caractérisée par de haut niveau de cystéine au sein de leur séquence et par leur capacité de séquestration de métaux tels le zinc, le cadmium et le cuivre libre. MT2A joue un rôle important dans l'homéostasie des ions métalliques, dans la protection contre la toxicité des métaux ainsi que dans les mécanismes de contrôle et de prévention des stress oxydatifs (Mocchegiani *et al.*, 2001; Ebadi *et al.*, 2005).

#### 4. Implication du cuivre dans diverses pathologies liées au vieillissement

Les pathologies liées à une déficience ou à une accumulation de cuivre au sein de l'organisme peuvent être génétiques ou acquises (Linder *et al.*, 1998). Une déficience chronique en cuivre dans le régime alimentaire semble être un facteur contribuant au développement de l'ostéoporose et de maladies cardiovasculaires, toutes deux intimement liées avec le vieillissement (Joseph *et al.*, 1996).

Le cuivre semble jouer un rôle prépondérant dans les maladies neurodégénératives liées à la protéine Prion (PrP). La protéine Prion est une glycoprotéine de surface exprimée de manière abondante dans le système nerveux central mais sa fonction biologique n'est pas



encore clairement élucidée. Cette protéine possède dans sa séquence des régions de répétitions octapeptidiques lui conférant la propriété de lier certains métaux bivalents, dont le cuivre, suggérant ainsi qu'elle joue un rôle dans la protection des altérations créées par les métaux.

De nombreuses études ont montré un rôle de protection de la PrP contre le stress oxydatif (Brown *et al.*, 2002; Herms *et al.*, 1999). Le  $\text{Cu}^{++}$ , connu pour engendrer des ROS, est capable de se lier avec la PrP. Les ROS entraînent des dommages cellulaires divers tels les dommages à l'ADN et l'activité antioxydante de la PrP a été attribuée à sa capacité à lier le  $\text{Cu}^{++}$  (Watt *et al.*, 2007). Les maladies relatives à la protéine Prion représentent un groupe d'affections neurodégénératives qui comprend, entre autre chez l'homme, la maladie de Creutzfeldt-Jacob (MCJ) (Desai and Kaler, 2008; Varela-Nallar *et al.*, 2006).

Le cuivre peut également jouer un rôle important dans la maladie d'Alzheimer (Adlard and Bush, 2006; Strozyk *et al.*, 2007). La maladie d'Alzheimer est caractérisée par l'accumulation de peptide  $\beta$ -amyloïde 42, résultant en la formation de plaques amyloïdes ou plus communément appelées plaques séniles. Le peptide  $\beta$ -amyloïde 42 est généré à partir de l'APP (Amyloid Precursor Protein) après son clivage par une  $\beta$ -secrétase. Il a été démontré que ce précurseur d'amyloïde possédait un domaine de liaison au cuivre, permettant sa réduction sous sa forme  $\text{Cu}^+$ , ce qui génère des dommages oxydatifs (Strozyk *et al.*, 2007; White *et al.*, 2002).

De plus, le peptide  $\beta$ -amyloïde 42 lie le cuivre et le cholestérol, facilitant ainsi l'oxydation du cholestérol en une forme hautement toxique pour les neurones (Nelson and Alkon, 2005). Enfin, il a été démontré que des interactions anormales entre le peptide  $\beta$ -amyloïde 42 et le cuivre, le zinc ou le fer entraîne l'agrégation et l'oxydation de peptides dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Strozyk *et al.*, 2007).

Les maladies de Menkes et de Wilson, caractérisées respectivement par une déficience et une accumulation du cuivre, sont des maladies de type génétique (**Figure II.3**). Il est accepté de manière commune que la prévalence des maladies susmentionnées augmente avec l'âge. La maladie de Menkes est liée au chromosome X et associée à une activité réduite de certaines cuproenzymes incluant la cytochrome c oxydase (Madsen and Gitlin, 2007). Il a été montré, chez des patients atteints de cette maladie, une accumulation de cuivre dans les cellules épithéliales de l'intestin. Cela suggère que le cuivre alimentaire ne peut plus être distribué au niveau du sang. Chez ces mêmes patients, le transport de cuivre au niveau du cerveau était sévèrement réduit. La maladie de Wilson est causée par une ou plusieurs mutation(s) du gène codant pour la protéine Mnk ou ATP7A, une ATPase transportant le cuivre. Il semblerait que le transport intercellulaire de cuivre, par exemple entre le sang et la barrière hémato-encéphalique peut se faire grâce à la présence d'ATP7A fonctionnelle. Il est dès lors compréhensible que les traitements au cuivre ne soit pas efficaces chez les patients atteints de la maladie de Menkes vu que le transport du cuivre vers le cerveau est dépendant de ATP7A. Les rares patients avec une activité ATP7A résiduelle ont, bien qu'ayant la maladie, beaucoup moins de symptômes pathologiques au niveau de leur système nerveux central (Mendelsohn *et al.*, 2006). De plus, une amélioration est visible lorsque ces patients reçoivent un supplément de cuivre.

La maladie de Wilson est une pathologie autosomale récessive liée au transport du cuivre. Les individus atteints de la maladie montrent une accumulation excessive de cuivre au niveau du foie et du cerveau, une biosynthèse déficiente de céruloplasmine et une excrétion biliaire de cuivre anormale (Madsen and Gitlin, 2007; Tao and Gitlin, 2003). Le gène ATP7B,



déficient dans la maladie de Wilson, encode pour une protéine transporteuse de cuivre, Atp7b, partageant 55 % d'homologie avec l'ATP7A, citée ci-dessus dans la maladie de Menkes (Strausak *et al.*, 2001). La neurodégénérescence associée à la maladie de Wilson résulte d'une accumulation directe du cuivre, mais les mécanismes précis sous-jacent demeurent à ce jour inconnus (Madsen and Gitlin, 2007).

Dans le cas de la maladie de Wilson, l'accumulation de cuivre au sein de la mitochondrie conduit à des dommages oxydatifs prématurés de l'ADN mitochondrial (Mansouri *et al.*, 1997). Cette maladie est également caractérisée par une accumulation de cuivre au sein du noyau cellulaire (Rodriguez and Akman, 1998; Li *et al.*, 2007). Ces auteurs suggèrent que cela pourrait conduire à l'arrêt du cycle cellulaire et à des dommages à l'ADN. Ces différentes conséquences comptent parmi les critères principaux du mécanisme général de vieillissement. Il semble dès lors intéressant d'étudier de manière plus approfondie les éventuels liens entre l'homéostasie du cuivre et les mécanismes du vieillissement.

## 5. Implication du cuivre dans la sénescence

Un lien entre la sénescence et une concentration élevée en cuivre a été établi chez le champignon *Podospora anserina*. Les auteurs de cette étude ont observé une augmentation de la concentration cytosolique en cuivre liée à une augmentation de l'abondance des transcrits de différents gènes régulés par le cuivre ainsi que des changements d'activités au niveau de la Cu-Zn superoxyde dismutase (SOD) lors de la sénescence chez *Podospora anserina*. (Borghouts and Osiewacz, 1998b; Borghouts *et al.*, 2000a).

Des études complémentaires ont également mis à jour une augmentation de l'espérance de vie de plus de 60 % chez des souches de *Podospora anserina* possédant une mutation au niveau du gène *Grisea*, un facteur de transcription (Borghouts *et al.*, 2001b). Chez ces mutants, un gène codant pour une protéine transporteur de cuivre à haute affinité n'est pas exprimé, entraînant une diminution importante du niveau de cuivre intracellulaire. De plus, ces auteurs ont également démontré une diminution drastique de la présence d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) au niveau de la membrane mitochondriale interne chez ces mutants *Grisea*. L'augmentation de l'espérance de vie chez *Podospora anserina* muté et donc, l'apparition beaucoup plus tardive de la sénescence, est une conséquence directe de la déplétion en cuivre intracellulaire, résultant en une diminution des stress oxydatifs au sein de la cellule.

Il existe certains mécanismes communs impliqués dans la sénescence qui sont relativement bien conservés au cours de l'évolution. L'équipe de Barbieri a mis en évidence un lien entre la sénescence et les voies de signalisation du facteur de croissance à l'insuline (IGF-1) chez différentes espèces (Barbieri *et al.*, 2003). Ces auteurs ont montré qu'une mutation des gènes au niveau de la cascade des voies de signalisations du facteur de croissance à l'insuline était capable d'augmenter de manière significative l'espérance de vie chez diverses espèces, incluant *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* mais également chez les mammifères. Ceci suggère la possibilité que certains mécanismes fondamentaux du vieillissement sont conservés à travers l'évolution, des levures aux mammifères (Hinkal and Donehower, 2008; Chistiakova, 2008; Ksiazek *et al.*, 2008; Anisimov, 2008).



L'existence d'une relation entre les changements de concentration intracellulaire en cuivre et la sénescence chez *Podospora anserina*, la conservation au sein de différentes espèces de protéines jouant un rôle prépondérant dans le métabolisme du cuivre et le fait que certains mécanismes du vieillissement sont également conservés au cours de l'évolution (Barbieri *et al.*, 2003), suggèrent qu'il existe une relation particulière entre le cuivre et le vieillissement chez les mammifères.



## Objectifs du mémoire

Le but de ce mémoire est d'étudier la relation entre le cuivre et la sénescence cellulaire chez les fibroblastes de poumons humains WI-38 (**Figure II**). Cette hypothèse provient de plusieurs observations dont la mise en évidence d'une relation entre le cuivre et la sénescence chez le champignon *Podospora anserina*, mais aussi du niveau de conservation élevé au cours de l'évolution de nombreuses protéines fondamentales au métabolisme lié au cuivre (Borghouts and Osiewicz, 1998b; Borghouts *et al.*, 2001b; Mocchegiani *et al.*, 2001; Slebos *et al.*, 2003), ou encore du fait que de certains mécanismes du vieillissement soient conservés chez différentes espèces au cours de l'évolution (Barbieri *et al.*, 2003).

Afin de réaliser cette étude sur la relation entre le cuivre et la sénescence de cellulaire, nous commencerons par mettre au point un modèle d'exposition des fibroblastes humains WI-38 au sulfate de cuivre, CuSO<sub>4</sub>. Ensuite, nous évaluerons les changements potentiels d'abondance de transcrits dont l'abondance est connue pour être modulée par le cuivre, comme la heat shock protein 70 (Hsp70), la hème oxygénase (Hmox-1), la protéine prion (PrP) ainsi que la métallothionéine 2 A (MT2A). Nous étudierons également leurs changements éventuels d'abondance protéique après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>.

Ensuite, afin de savoir si ces gènes modulés par le cuivre sont également surexprimés dans un modèle connu de la sénescence induite prématurément par les stress chez ces mêmes fibroblastes, nous évaluerons l'expression des gènes MT2A, PrP, Hmox-1 et Hsp70 dans un modèle de sénescence induite prématurément par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, plusieurs études ont démontré qu'une exposition à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> des fibroblastes WI-38 entraîne l'apparition de sénescence cellulaire (de Magalhaes *et al.*, 2004; Fripiat *et al.*, 2002).

L'étape suivante consistera à étudier l'induction de biomarqueurs de la SIPS suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. De manière plus précise, nous étudierons la morphologie cellulaire, la proportion de cellules présentant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, l'éventuel arrêt de prolifération cellulaire et l'induction de gènes connus pour être surexprimés lors de la sénescence comme la *fibronectine*, l'*apolipoprotéine J* (*ApoJ*), le *Connective Tissue Growth Factor* (*CTGF*), l'*Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3* (*IGFBP3*), *p21<sup>waf-1</sup>* ou encore le *Transforming Growth factor beta-1* (*TGF $\beta$ -1*).

Le TGF $\beta$ -1 joue un rôle dans l'apparition de plusieurs marqueurs de sénescence cellulaire dans différents modèles de SIPS (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005; Fripiat *et al.*, 2001b). Le rôle du TGF $\beta$ -1, ainsi que l'implication potentielle du cuivre dans les mécanismes de sénescence, nous amènerons à étudier la modulation de l'expression des gènes d'intérêt, régulés par le cuivre, suite à la stimulation des fibroblastes WI-38 avec du TGF $\beta$ -1.

Enfin, afin d'essayer de comprendre les causes de l'apparition de biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>, nous évaluerons d'une part, la présence éventuels de stress oxydatifs au sein des fibroblastes et d'autre part, la présence potentiels de dommages à l'ADN suite à cette exposition.



# Matériels et Méthodes

## 1. Culture Cellulaire

### *1.1. Matériel*

Voir tableau 1

### *1.2. Méthode*

Les cellules utilisées dans le cadre de ce travail sont des fibroblastes foetaux de poumons humain de souche WI-38 (CCL75; American Type Culture Collection, ATCC, USA). Les cellules WI-38 sont cultivées dans des boîtes de culture T75 dans une étuve à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules sont cultivées dans 15 ml de milieu Basal Medium Eagle (BME, GIBCO-Invitrogen, Royaume-Uni) contenant 10% de sérum de veau fœtal (GIBCO, Royaume-Uni) et 2 mM de L-glutamine (Gibco-Invitrogen, Royaume-Uni). Les cellules sont repiquées tous les 2-3 jours selon le procédé suivant.

Le milieu de culture est décanté et la boîte de 75 cm<sup>2</sup> (T75) est rincée avec 5 ml de tampon phosphate salin (PBS) (Lonza, Belgique) stérile. Après avoir décanté le PBS, les cellules sont détachées du fond de la boîte par un ajout de 500 µl de trypsine (GIBCO, Royaume-Uni) suivi d'une incubation de 5-10 min à 37°C. Lorsque les cellules sont détachées du fond de la boîte, 10 ml de milieu de culture complet (BME + 10% de sérum de veau fœtal) sont ajoutés afin de neutraliser la réaction de trypsinisation. L'entièreté de cette suspension cellulaire est alors répartie dans deux nouvelles T75 contenant du milieu complet afin d'atteindre un volume final de 15 ml. Les boîtes sont alors placées dans l'étuve. Les cellules qui ne se divisent plus après deux semaines sont considérées comme étant en sénescence répliquative (HAYFLICK and MOORHEAD, 1961)

## 2. Exposition des fibroblastes WI-38 au sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>)

Les fibroblastes WI-38 sont incubés avec 500 µM de CuSO<sub>4</sub> dilué dans le milieu BME complet (BME + 10% de sérum de veau fœtal) pendant 16 h dans une étuve à atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Après l'exposition au CuSO<sub>4</sub>, les cellules sont lavées avec du PBS et sont ensuite incubées avec du milieu BME + 10% de sérum de veau fœtal dans cette même étuve.

## 3. Sénescence induite prématurément par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Les fibroblastes WI-38 sont incubés avec 100µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilué dans le milieu BME complet (BME + 10% de sérum de veau fœtal) pendant 2 h dans l'étuve. Après l'exposition à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les cellules sont lavées avec du PBS et sont ensuite incubées avec du milieu BME + 10% FBS de nouveau dans l'étuve.



#### 4. Stimulation des fibroblastes WI-38 avec du TGFβ-1

D'autres cellules WI-38 sont stimulées de manière continue avec du Transforming Growth Factor beta-1 (TGFβ-1) à une concentration de 5ng/ml dilué dans du milieu BME + 10% de sérum de veau fœtal. Du nouveau TGFβ-1 est ajouté toutes les 24 h pendant 3 jours. Après les 3 jours de stimulation avec du TGFβ-1, les cellules sont lavées avec du PBS et sont ensuite incubées avec du milieu BME + 10% FBS.

#### 5. Incubation des fibroblastes WI-38 avec un anticorps neutralisant le TGFβ-1

Les cellules WI-38 sont incubées avec un anticorps neutralisant le TGFβ-1 à une concentration de 3 µg/ml dilué dans du milieu BME + 10% de sérum de veau fœtal. Après l'incubation avec l'anticorps neutralisant du TGFβ-1, les cellules sont exposées pendant 16 h avec 500 µM de CuSO<sub>4</sub>.

#### 6. Détermination de la viabilité cellulaire par la méthode du MTT

##### *6.1.Principe*

Les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT et le clive en son dérivé formazan qui se présente sous la forme de cristaux visibles à l'œil nu et insolubles en milieu aqueux. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale : la succinate deshydrogénase. En présence d'une molécule toxique, le nombre de cellules capables de réaliser cette réaction diminue et une corrélation peut dès lors être établie entre l'absorbance à 570 nm (ce qui correspond à la quantité de MTT réduit) et la viabilité cellulaire.

##### *6.2.Matériel*

Voir tableau 2

##### *6.3.Méthode*

Les cellules sont incubées en présence de la molécule à tester dans des boîtes de 25 cm<sup>2</sup> (T25). Quand la stimulation est finie, on prend 3 ml du milieu de la T25 et on les met dans un tube 10 ml. On ajoute ensuite 3 ml de solution de coloration dans ce tube. On décante le reste du milieu de la T25 et on y met les 6 ml (½ milieu, ½ solution de coloration). On incube ensuite les cellules 3 h à 37°C + 5 % CO<sub>2</sub>. Ensuite, on décante et on ajoute 6,5 ml de solution de lyse/T25 (Janssen Chimica, Belgique). On incube alors les plaques à 37°C en chambre chaude avec une petite agitation.

Le lendemain, on met 2 ml dans 3 puits d'une plaque 6 puits + 2 ml de solution de lyse dans les 3 autres puits (blancs) et on lit les plaques à 570 nm.



## 7. Activité $\beta$ -galactosidase associé à la sénescence

### 7.1. Matériel

Voir tableau 3

### 7.2. Méthode

Les cellules sont repiquées en plaque 6 puits (Corning, USA) à une densité de 2.000 cellules/cm<sup>2</sup>, 24 h après la fin de l'exposition au CuSO<sub>4</sub>. 72 h après la fin de l'exposition au CuSO<sub>4</sub>, décanter le milieu de culture et les rincer 2x avec du PBS. Fixer ensuite les cellules dans la solution de fixation pendant 5 min. Rincer les cellules 2x avec du PBS. Incuber les cellules dans la solution de révélation pendant 12 à 16 h à 37°C, sans CO<sub>2</sub> et à l'abri de la lumière. Quand la coloration est nette, rincer les cellules 2x avec du PBS, puis 2x avec du méthanol (Acros Organics, Belgique). Laisser sécher les cellules à température ambiante. A l'aide d'un microscope optique, déterminer la proportion de cellules présentant une activité SA  $\beta$ -gal (compter au minimum 400 cellules dans chaque puits) (Dimri *et al.*, 1995).

## 8. Incorporation de la Thymidine Tritiée

La mesure de l'incorporation en thymidine tritiée par les fibroblastes WI-38 permet d'estimer leur potentiel prolifératif.

### 8.1. Matériel

Voir tableau 4

### 8.2. Méthode

Les cellules sont repiquées 24 h après la fin de l'exposition au CuSO<sub>4</sub> à une confluence de 5.000 cellules par cm<sup>2</sup> dans une plaque 24 puits. 48 h après la fin de l'exposition au CuSO<sub>4</sub>, les cellules sont incubées dans du milieu BME + 10 % FBS additionné de 1  $\mu$ Ci/ml de thymidine tritiée (=1  $\mu$ l [3H]-T/1 ml milieu) (NEN, Boston, USA). Incuber les cellules 24 h dans une étuve à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Ceci permet aux cellules d'incorporer la thymidine tritiée. Décanter le milieu de culture et rincer les cellules 2x avec du PBS, 1x avec du TCA 10 % (préalablement refroidi sur glace) (SDS, France), 1x avec de l'éthanol 70 % (SDS, France) et 1x avec du PBS. Décanter à fond et ajouter 250  $\mu$ l de NaOH 0,5 M (Merck, Allemagne) et laisser incuber 30 min. Neutraliser la réaction au moyen de 250  $\mu$ l d'HCl 0,5 M (Merck, Allemagne). Après homogénéisation à la pipette Pasteur, reprendre le lysat cellulaire dans une fiole et y ajouter 5 ml d'Aqualuma (Luma, Pays-Bas). L'Aqualuma



va permettre de convertir l'énergie présente dans l'émulsion de radioactivité du lysat cellulaire en énergie lumineuse. Agiter fortement la fiole et la placer dans le compteur à scintillation.

## 9. Dosage protéique par la méthode de Folin

Le dosage protéique par la méthode de Folin est réalisé 72 h après la fin de l'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ . Celui-ci permet de normaliser l'incorporation de la thymidine tritiée par microgramme de protéines issues de fibroblastes WI-38.

### 9.1. Matériel

Voir tableau 5

### 9.2. Méthode

Rincer les cellules 2x avec du PBS froid.

Ajouter 1 ml de NaOH 0,5 N pour lyser les cellules et incuber au minimum 30 min.

Mélanger vigoureusement l'extrait cellulaire.

Prélever 400  $\mu\text{l}$  du lysat et placer dans un tube de 4 ml.

Ajouter 2 ml de solution saline de 30 sec en 30 sec.

Après 15 min ajouter 200  $\mu\text{l}$  de solution de Folin (Merck, Allemagne), agiter immédiatement.

Après 30 min, lire l'absorbance à 740 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Réaliser 1 blanc avec de l' $\text{H}_2\text{O}$ . Réaliser une droite standard à l'aide d'une solution contenant 0, 50, 100 et 200  $\mu\text{g/ml}$  de BSA (Bovine Serum Albumine) (PAA laboratories Gmgh) dans du NaOH 0,5 N. La concentration en protéines des échantillons est calculée à partir de cette droite.

## 10. Extraction protéique totale

### 10.1. Matériel

Voir tableau 6

### 10.2. Méthode

Les extraits protéiques totaux sont préparés à partir des cellules cultivées dans des boîtes. Après incubation, les T25 sont immédiatement placées sur glace. Les cellules dans les boîtes de 25  $\text{cm}^2$  sont raclées dans 150  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse à l'aide d'un racloir de 24 mm. Le lysat cellulaire est entièrement récupéré et mis dans la première série de microtubes placée sur glace. Plusieurs mouvements de haut en bas sont réalisés à l'aide d'une micropipette afin de lyser complètement les cellules. Les microtubes sont alors centrifugés pendant 5 min, à 13.000 rpm, à 4°C afin de sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant est transféré dans la



deuxième série de microtubes. La concentration en protéines de chaque échantillon est dosée par la méthode de Bradford.

## 11. Dosage des échantillons protéiques par la méthode de Bradford

### 11.1. Matériel

Voir tableau 7

### 11.2. Méthode

2 µl d'extraits protéiques sont ajoutés toutes les 30 sec dans 1 ml de solution Bradford (Biorad, Allemagne). 5 minutes après l'ajout de l'extrait, la densité optique (D.O) est lue à 595 nm grâce à un spectrophotomètre préalablement mis à zéro avec de l'eau distillée. La cuvette est rincée à l'acétone puis à l'eau distillée entre chaque mesure.

Il est important de réaliser différents contrôles afin de normaliser les valeurs. Pour ce faire, des mesures de D.O sont réalisées respectivement sur l'eau (blanc étalon), le tampon de lyse (blanc) et l'étalon (BSA à 2 µg/µl). Tous les dosages sont effectués en dupliquats. Afin de calculer la concentration en protéines présente dans les échantillons, nous utilisons la formule suivante :

$$\frac{((\text{Moyenne Test} - \text{Moyenne Blanc}) / (\text{Moyenne Etalon} - \text{Moyenne Blanc Etalon})) \times (\text{Cc Etalon} \times \mu\text{l étalon})}{\text{Volume des échantillons}} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

## 12. Western Blotting

### 12.1. Principe

Le Western Blot est une technique semi-quantitative qui permet de séparer les protéines par électrophorèse dans un gel. Les extraits protéiques obtenus sont chargés sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) qui dénature les protéines en les chargeant négativement. Sous l'effet d'un courant électrique passant dans la cuve d'électrophorèse, les protéines migrent dans le gel en fonction de leur poids moléculaire. Lorsque la migration est terminée, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène fluorure (PVDF). La protéine d'intérêt est détectée à l'aide d'un anticorps primaire spécifique dont le fragment Fc (fragment constant) est reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La protéine d'intérêt est alors révélée par chémoluminescence grâce à l'activité de la peroxydase : la membrane est mise en contact avec le substrat de la peroxydase, le luminol, ainsi qu'avec de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'oxydation du luminol par la peroxydase s'accompagne de la production de photons qui sont détectés au moyen d'un film photosensible.



## 12.2. Préparation des échantillons dans des microtubes

Un volume bien précis de chaque extrait protéique est prélevé de manière à charger 10 µg de protéines par puits. Les volumes sont ensuite portés à 40 µl avec de l'eau distillée et 10 µl de bleu de charge 5x est ajouté à chaque échantillon (tableau 8). Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 5 min afin de dénaturer les protéines puis brièvement centrifugés avant d'être chargés sur le gel.

## 12.3. Migration : Gels Tris-Glycine

### Matériel

Voir tableau 8

### Méthode

Lorsque le montage des plaques est réalisé, les gels sont coulés. Le gel séparateur est coulé entre les plaques jusqu'à environ 1 cm en dessous du peigne. Une fine couche d'isobutanol est déposée sur le gel afin de favoriser la polymérisation qui est inhibée en présence d'oxygène. Après 1 h de polymérisation, l'isopropanol/isobutanol est enlevé, la surface du gel abondamment rincée avec de l'eau distillée et l'excès d'eau est éliminé à l'aide d'un papier Whatman. Le gel concentrateur est alors coulé au dessus du gel séparateur jusqu'au bord des plaques et le peigne est glissé entre les plaques dans le gel afin de former les puits de chargement. Après 30 min de polymérisation, le peigne est délicatement retiré ainsi que le spacer inférieur. Le gel est monté dans la cuve (Life technologies Model V15.17, Invitrogen, USA), la petite plaque vers le compartiment central. Le running buffer est ensuite ajouté dans le compartiment central jusqu'au bord de la petite plaque et dans le compartiment inférieur. A l'aide d'une seringue à pointe fine, les bulles d'air sont éliminées et les puits sont rincés avec le tampon. Les échantillons et l'étalon de poids moléculaire (Seebue Plus 2 Prestained, Invitrogen, USA) sont chargés dans les puits. La migration se déroule pendant 30 min à 35 mA (à travers le gel concentrateur) et pendant environ 3 h à 45 mA (à travers le gel séparateur) à l'aide d'un générateur (Pharmacia Biotech Electrophoresis Power Supply EPS 3500, Royaume-Uni).

## 12.4. Transfert

### Matériel

Voir tableau 9

### Méthode

La membrane doit toujours être manipulée avec des gants. Pendant 1 min, la membrane de PVDF est réhydratée dans du méthanol 100%. Puis, pendant 5 min la membrane est équilibrée dans le tampon de transfert (blotting buffer). Ensuite la membrane est déposée sur le gel. Des papiers Whatman et des éponges sont également disposés selon un système sandwich. Ce système sandwich est réalisé dans l'appareil de transfert. Chaque constituant du sandwich est



mouillé avec du tampon de transfert. Entre chaque couche du sandwich, les bulles d'air sont éliminées car celles-ci pourraient gêner le passage du courant électrique et perturber le transfert. Une intensité électrique, soit de 30 mA pendant une nuit ou soit 150mA pendant 2 h est appliquée pour permettre le transfert des protéines sur la membrane.

### 12.5. *Traitement de la membrane et révélation*

#### *Matériel*

Voir tableau 10

#### *Méthode*

La membrane est alors bloquée dans du TBS Tween 0,1 % (TBS-T) + 2 % d'agent bloquant. Le blocage se fait pendant 2 h à température ambiante sur rouleau afin de bloquer les sites de fixation non spécifiques. Ensuite, la membrane est incubée 2 h à RT ou 16 h à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans du TBS-T + 2 % d'agent bloquant (tableau 11). Après cette incubation, la membrane est rincée 3 fois 20 min dans un grand volume de TBS-T. L'anticorps secondaire est dilué 300 000 fois dans le TBS-T+ 2 % agent bloquant, puis placé sur la membrane pendant 1h à RT. Finalement, la membrane est rincée 3x20 min dans un grand volume de TBS-T avant d'être recouverte de solution ECL pendant 3 min. La révélation se fait en chambre noire en déposant un film photosensible sur la membrane pendant des temps variables. Le film est ensuite révélé pour la protéine d'intérêt.

## 13. Marquage en Immunofluorescence

### 13.1. *Principe*

L'immunofluorescence est une technique destinée à détecter un antigène par émission de fluorescence. La préparation est examinée au microscope confocal. Un anticorps non marqué va se fixer sur un antigène. Cet anticorps va être reconnu par un anticorps anti-immunoglobuline, marqué par un fluorochrome, une sonde Alexa. Cette sonde fluorescente est visible au microscope confocal, ou elle peut émettre dans le vert (488 nm).

#### *Matériel*

Voir tableau 12

#### *Méthode*

Les cellules sont repiquées à la densité de 20.000 cellules par puit sur des couvre-objets stérilisés à la flamme et déposés au fond des puits d'une plaque 24 puits. 24 heures après, elles sont incubées en présence de CuSO<sub>4</sub> durant 16 h. A différent temps après l'incubation, les plaques sont décantées et les cellules sont fixées 10 min avec 500 µl de PBS-PFA 4% à température ambiante. Les puits sont ensuite rincés 3x avec du PBS. Les cellules sont perméabilisées avec 500 µl de PBS-Triton 1% pendant 5 min. Les puits sont de nouveau



rincés 3x avec du PBS-BSA 2%. La chambre humide d'incubation est alors préparée en mouillant un papier Whatman recouvert de parafilm.

Une goutte de 30 µl d'anticorps primaire dilué dans du PBS-BSA 2% est déposée sur le parafilm (Tableau 13). Chaque couvre-objet est alors récupéré du fond des puits et retourné sur la goutte d'anticorps primaire. L'incubation se fait pendant 2 h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Ensuite, les couvre-objets sont replacés dans la plaque 24 puits où ils sont rincés 3x avec du PBS-BSA 2%. Les couvre-objets sont ensuite mis en présence de l'anticorps secondaire dilué dans la chambre humide et incubés pendant 1h à température ambiante dans l'obscurité (Tableau 13). Les couvre-objets sont encore rincés 3x avec du PBS-BSA 2% et 1x avec du PBS seul.

Afin de marquer le noyau, une incubation de 30 min en chambre humide et à l'obscurité est réalisée en présence de To-PRO 3 dilué 80x dans une solution de RNase (2 mg/ml PBS). Une fois tous les marquages effectués, les couvre-objets sont rincés 3x dans du PBS puis montés sur lames à l'aide de Mowiol. Les lames sont alors conservées une nuit à 4°C avant d'être observées au microscope confocal à fluorescence.

## 14. Extraction d'ARN total

### 14.1. Matériel

Voir tableau 14

### 14.2. Méthode

La méthode comprend 4 étapes principales : la lyse des fibroblastes WI-38, la dénaturation des complexes nucléoprotéiques, l'inactivation de l'activité des ribonucléases endogènes et l'élimination de l'ADN et des protéines contaminantes.

#### ▪ Extraction d'ARN Total

Rincer les cellules 1x avec 5 ml de PBS par boîte de culture de 25 cm<sup>2</sup>. Décanter à fond. Ajouter 300 µl de solution dénaturante et racler les cellules. La solution dénaturante contient deux inhibiteurs de RNase, le guanidine thiocyanate et le β-mercaptoéthanol. Le guanidine thiocyanate et le N-lauryl sarcosine aussi présent dans cette solution permettent la disruption des complexes nucléoprotéiques.

Transférer le lysat cellulaire dans un microtube.

Ajouter 30 µl d'acétate de sodium 2 M. Mélanger en inversant les tubes 4-5 fois.

Ajouter 300 µl de Phénol : Chloroforme : Alcool Isoamyl (PCI alcool) afin d'enlever les protéines et l'ADN chromosomique contaminants.

Agiter rapidement pendant 10 sec jusqu'à l'apparition d'un composé blanchâtre.

Incuber 15 min sur glace et centrifuger à 4°C pendant 20 min à 12.000 tours par minutes.

#### ▪ Précipitation et resuspension de l'ARN Total



Récupérer délicatement la phase supérieure aqueuse qui se situe juste au dessus de la galette de protéines. Cette phase aqueuse supérieure contient l'ARN total.  
Transférer l'ARN total dans un nouveau microtube.  
Ajouter un volume égal d'Isopropanol.  
Agiter et incubé à -20°C pendant minimum 30 min  
Centrifuger 10 min à 4°C à 12.000 tours par minutes et éliminer le surnageant.

▪ Lavage de l'ARN Total

Resuspendre le culot avec 1 ml d'éthanol 75 % glacé.  
Agiter rapidement puis centrifuger pendant 10 min à 12.000 tours par min.  
Éliminer le surnageant et laisser sécher le culot à l'air durant quelques min.  
Une fois sec, resuspendre dans 20 µl d'eau sans RNase et quantifier par lecture de la DO à 260 nm au spectrophotomètre (dilution 50x).

## 15. Transcription inverse

### 15.1. Principe

La transcription inverse est la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice ARN messagers (ARNm) grâce à l'ADN polymérase ARN dépendante ou transcriptase inverse. La rétrotranscription permet de générer, de manière non spécifique, l'ADN complémentaire aux ARNm d'un échantillon d'ARN total grâce à l'utilisation d'amorces poly-T.

### 15.2. Matériel

Voir tableau 15

### 15.3. Méthode

Dans un microtube sans RNase, placer 2 µg/9 µl d'ARN total dilué dans de l'eau sans RNase, en présence de 1 µl d'Oligonucléotide dT et incubé 10 min à 70°C.

Préparer le mélange suivant :

- 4 µl buffer RT 5x
- 2 µl DTT
- 1 µl RNAsin
- 2 µl DNTP mix

Ajouter 9 µl de mélange par échantillon et incubé 2 min à 42°C.

Ajouter 1 µl de SuperScript II Reverse Transcriptase par échantillon.

Incuber 1 h à 42°C puis stopper la réaction 15 min à 70°C.

Ajouter 1 µl de Ribonuclease H et incubé 20 min à 37°C.

Congeler immédiatement à -20°C.



## 16. PCR en temps réel

### 16.1. Principe

La PCR en temps réel est une méthode permettant de détecter l'expression de transcrits même faiblement abondants. Cette technique est basée sur la détection et la quantification d'un agent intercalant fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits au cours de la réaction.

La PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) est une technique d'amplification logarithmique de séquences d'ADN spécifiques réalisée au moyen d'amorces complémentaires encadrant la séquence à amplifier. Dans le cadre de la PCR en temps réel, la quantité d'amplicons produits pendant la réaction est mesurable notamment par l'intensité de fluorescence d'une molécule qui s'intercale de manière non spécifique dans l'ADN double brin, le SYBR Green. Cette molécule est ajoutée au mix PCR de départ et émet un signal fluorescent proportionnel à la quantité d'ADN double brin. Cependant, le SYBR Green s'intercale de façon non spécifique dans l'ADN double brin. Afin de s'assurer de la spécificité de l'amplicon, une augmentation progressive de la température de 60 à 95°C en fin de PCR permet la dissociation des amplicons. Cette dissociation provoque une chute brutale de fluorescence. Si la dérivée de la courbe de dissociation en fonction du temps présente un pic unique, ceci reflète la présence d'une seule population d'amplicons.

Le signal est détecté à partir d'un certain seuil. Ce point où le signal de fluorescence est supérieur au bruit de fond est appelé le cycle seuil, Ct (cycle threshold). La valeur de Ct, obtenue au cours de la phase exponentielle d'amplification, sera toujours inversement proportionnelle à la quantité d'ADNc généré pendant la rétrotranscription, et donc à l'abondance d'ARNm présent au départ dans l'échantillon. Il faut ensuite normaliser les résultats obtenus, en utilisant la valeur de Ct d'un gène de référence, dont l'expression n'est pas censée être influencée par les conditions étudiées. Dans notre cas, nous avons utilisé 23KDa comme gène de référence. Les valeurs obtenues après normalisation nous serviront à comparer l'abondance de l'ARNm des gènes d'intérêt dans les différentes conditions.

### 16.2. Matériel

Voir tableau 17

### 16.3. Méthode

Les ADNc pour chaque condition sont dilués 100x dans de l'eau distillée. Un mix contenant du SYBR Green, des amorces sens, des amorces anti-sens et de l'eau est préparé, et 20 µl sont alors placés dans chaque puits. 5 µl d'ADNc dilué 100x sont alors ajoutés dans chaque puits correspondant. Les puits blanc reçoivent, quant à eux, 5 µl d'eau distillée. Chaque condition est réalisée en double. Les puits sont ensuite fermés par un film plastique autocollant et la plaque 96 puits est centrifugée brièvement. L'analyse des données et le traitement des résultats se font au moyen du programme SDS 2.2.1 (Sequence Detection System) d'Applied Biosystems, USA.



## 17. Mise en évidence de stress oxydatifs

### 17.1. *Incubation des cellules WI-38 avec la sonde DCF*

#### *Méthode*

Les cellules WI-38 sont repiquées en plaque 24 puits à une concentration de 20.000 cellules par puits. Le lendemain, les fibroblastes sont incubés avec la sonde H2DCF-DA à une concentration finale de 20  $\mu$ M. On incube ensuite les cellules pendant 30 min dans le noir à 37°C. Les fibroblastes WI-38 sont alors incubés avec 500  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> dilué dans le milieu BME complet (BME + 10% de sérum de veau fœtal) pendant 15 min, 30 min, 45 min, 1 h, 2 h ou 3 h dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. La plaque est lue à 520 nm au fluorimètre à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm).

### 17.2. *Incubation des cellules WI-38 au Trolox*

#### *Méthode*

Les cellules WI-38 sont incubées de manière continue 3x 8 h avec une nouvelle solution de Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8 tetramethylchroman-2-carboxylic Acid, Calbiochem, USA) à une concentration de 100  $\mu$ M dilué dans du milieu BME + 10% de sérum de veau fœtal. Après les 24 h d'incubation avec le Trolox, les cellules sont lavées avec du PBS et sont ensuite incubées avec du milieu BME + 10% FBS.



## Résultats et discussion

Des études récentes ont montré un lien entre la sénescence et une concentration élevée en cuivre chez le champignon filamenteux *Podospora Anserina*, ainsi qu'une relation entre l'expression de gènes régulés par le cuivre et la sénescence chez ces mêmes champignons (Borghouts and Osiewacz, 1998a; Borghouts *et al.*, 2000a). Par la suite, des études complémentaires ont mis à jour une augmentation de l'espérance de vie, liée de manière directe à une déplétion en cuivre, par l'induction d'une voie respiratoire alternative (Averbeck *et al.*, 2001; Borghouts *et al.*, 2001b).

Une telle relation étroite entre le cuivre et la sénescence chez les mammifères n'a, à ce jour, jamais été mise en évidence. Cependant, une étude récente de l'équipe de Zatta montre une augmentation, liée de manière étroite au vieillissement, de la concentration en cuivre et en zinc au niveau du cerveau de bovins âgés (Zatta *et al.*, 2008a).

Il est également intéressant de souligner qu'on a déjà découvert certains mécanismes communs impliqués dans la sénescence, et que ces mécanismes sont relativement bien conservés au cours de l'évolution. Par exemple, l'équipe de Barbieri a mis en évidence un lien entre le vieillissement et les voies de signalisation du facteur de croissance à l'insuline (Insulin like growth factor 1, IGF-1) chez différentes espèces (Barbieri *et al.*, 2003). Les auteurs ont montré qu'une mutation des gènes impliqués au niveau de la cascade des voies de signalisations du facteur de croissance à l'insuline IGF-1, était capable d'augmenter de manière significative l'espérance de vie chez diverses espèces, incluant *Saccharomyces cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* mais également chez les mammifères. Ceci suggère la possibilité que certains mécanismes fondamentaux du vieillissement soient conservés à travers l'évolution, des levures aux mammifères (Anisimov, 2008; Chistiakova, 2008; Hinkal and Donehower, 2008; Ksiazek *et al.*, 2008).

La relation entre le cuivre et la sénescence chez *Podospora anserina*, ainsi que le fait que d'une part, les protéines jouant un rôle important dans le métabolisme lié au cuivre soit conservées au cours de l'évolution (Song and Freedman, 2005), et que d'autre part, certains mécanismes du vieillissement soit également conservés chez différentes espèces au cours de l'évolution (Barbieri *et al.*, 2003), permettent de penser qu'il pourrait exister une relation particulière entre le cuivre et les mécanismes de la sénescence chez les mammifères.

### 1. Mise au point d'un modèle d'exposition des fibroblastes WI-38 au sulfate de cuivre, CuSO<sub>4</sub>.

Nous avons choisi comme modèle cellulaire les fibroblastes WI-38 du fait de leur utilisation courante dans des études de sénescence cellulaire. Afin d'établir un modèle d'exposition au cuivre de ces fibroblastes, nous avons exposé ces cellules au CuSO<sub>4</sub> dilué dans du milieu de culture BME additionné de 10% de FBS. Nous avons utilisé la méthode MTT afin d'évaluer la viabilité cellulaire suite à cette exposition au CuSO<sub>4</sub>. La viabilité cellulaire a été estimée après 16 h d'exposition au CuSO<sub>4</sub> à une concentration allant de 0 à 600 µM.



La figure IV.1 montre l'estimation de la viabilité des cellules WI-38 après une exposition de 16 h au  $\text{CuSO}_4$  pour des concentrations de 0, 400, 500 et 600  $\mu\text{M}$ . Une diminution de la viabilité cellulaire apparaît à la concentration de 500  $\mu\text{M}$ . En effet, une diminution de la viabilité cellulaire de 15 % et 60 % est observée pour les concentrations respectives de 500  $\mu\text{M}$  et 600  $\mu\text{M}$ .

Etant donné que nous testerons plus loin dans ce travail, si une exposition à une concentration sublétales en  $\text{CuSO}_4$  peut entraîner une sénescence cellulaire, nous avons retenu une exposition de 500  $\mu\text{M}$  en  $\text{CuSO}_4$  pendant 16 h pour les expériences ultérieures.

Afin de s'assurer que la toxicité observée ne soit pas le fruit de la présence de sulfate dans le milieu, nous avons également exposé les cellules au  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  pour la concentration maximale de 600  $\mu\text{M}$ . Aucune différence notable de viabilité cellulaire n'a pu être mise en évidence par rapport au cellules contrôle, confirmant ainsi que la diminution de la survie cellulaire est due au cuivre.

## 2. Effets de l'exposition de fibroblastes WI-38 au $\text{CuSO}_4$

Des études récentes ont mis en évidence une régulation de l'expression de gènes régulés par le cuivre (la heat shock protein 70 (Hsp70), la hème oxygénase-1 (Hmox-1), la protéine prion (PrP) ainsi que la métallothionéine 2 A (MT2A) chez le champignon *Podospora Anserina* (Borghouts and Osiewacz, 1998a; Borghouts *et al.*, 2000b). Après la mise au point du modèle d'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ , nous avons évalué les effets d'une telle exposition sur ces gènes modulés par le cuivre au niveau de l'abondance relative en ARNm et au niveau protéique.

### 2.1. Etude des variations d'abondance relative en ARNm de gènes régulés par le cuivre

L'abondance relative en ARN messager de ces gènes connus pour être régulés par le cuivre, MT2A, Hmox-1, Hsp70 et PrP, a été évaluée par la technique de RT-PCR en temps réel (Fig. IV.2.1). Pour ce faire, les fibroblastes WI-38 ont été exposés à une concentration de 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  pour une durée de 16 h. Nous avons réalisé une extraction de l'ARN 0, 24 et 72 h après la fin de l'exposition des cellules au  $\text{CuSO}_4$ . Pour ces expériences, l'abondance en ARNm de 23 kDa a été utilisée comme référence. Nos résultats ont été également normalisés par rapport à l'abondance de ces ARNm dans des cellules non exposées au  $\text{CuSO}_4$ . Nous avons aussi évalué les changements d'abondance relative de ces ARNm en présence de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  afin de tester si nos observations n'étaient pas la conséquence de la présence accrue de sulfate dans le milieu de culture cellulaire.

Les résultats montrent une augmentation de l'abondance relative en ARNm de MT2A d'un facteur 2 (Fig. IV.2.1A). Cette augmentation ne semble pas être dépendante du temps écoulé entre la fin de l'exposition des cellules WI-38 au  $\text{CuSO}_4$  et l'extraction d'ARN effectuée, pour un intervalle de temps entre 0 et 72 h après exposition au  $\text{CuSO}_4$ .

L'abondance relative en ARNm d'Hsp70 est multipliée par un facteur 4 directement à la fin de l'exposition des cellules au  $\text{CuSO}_4$  alors qu'aucune augmentation n'est observée 24



et 72 h après la fin de l'exposition des fibroblastes WI-38 au sulfate de cuivre (**Fig. IV.2.1B**). Hsp70 semble donc être induite de manière transitoire dans ce modèle au CuSO<sub>4</sub>.

L'abondance relative en ARNm de la PrP diminue de 50% directement après la fin de l'exposition au CuSO<sub>4</sub> (**Fig. IV.2.1C**). Cependant, ce phénomène n'est plus observé 24 h après la fin de l'exposition, où l'on peut remarquer une multiplication par un facteur 2 de l'abondance relative en ARNm de PrP. Aucune différence par rapport au contrôle ne fut observée 72 h après la fin de l'exposition des cellules WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. Ces observations peuvent nous laisser supposer que l'induction de PrP dans ce modèle soit limitée dans le temps.

L'abondance relative en ARNm d'Hmox-1 est multipliée par un facteur 6 directement à la fin de l'exposition des cellules au CuSO<sub>4</sub> (**Fig. IV.2.1D**). Ce phénomène d'augmentation de l'abondance relative en ARNm d'Hmox-1 n'est plus observé 24 et 72 h après la fin de l'exposition des fibroblastes WI-38 au sulfate de cuivre. Ces observations montrent donc également une augmentation transitoire de l'abondance relative en ARN messager de ce gène.

L'exposition des fibroblastes WI-38 au Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> n'engendre pas de modification notable de l'abondance de l'ARNm de ces 4 gènes. Au vu de ces observations, nous pouvons conclure que, bien que dans des amplitudes et temps variables, les 4 gènes MT2A, Hmox-1, Hsp70 et PrP sont induits de manière spécifique par le cuivre dans ce modèle d'exposition cellulaire au CuSO<sub>4</sub>.

Lors de cette étude, nous avons obtenus des résultats où, outre pour la protéine MT2A, l'augmentation en abondance relative en ARNm des protéines étudiées n'était observée que pour des temps spécifiques, à savoir directement après la fin de l'exposition pour les protéines Hsp70 et Hmox-1 et à 24h pour la protéine PrP. Ces résultats suggèrent donc que, suite à l'exposition des fibroblastes WI-38, l'induction de ces gènes connus pour être modulés par le cuivre est transitoire. Ce phénomène n'a pas été spécifiquement observé à l'heure actuelle, la plupart des études montrant des résultats ponctuels. Cependant, selon l'hypothèse que l'augmentation de l'abondance relative en ARNm soit induite par le cuivre, il semble logique que l'induction observée soit dans les temps les plus proches de la fin de l'exposition des cellules au cuivre.

Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature, où l'induction des gènes étudiés lors de ce travail a été observée dans différentes études. Par exemple, l'abondance relative en ARNm des protéines MT2A, Hmox-1 et Hsp70 était accrue dans des cellules HepG2 suite à une exposition de 4h et 24h au cuivre (Song and Freedman, 2005; Wirth *et al.*, 2002).

## *2.2. Etude des variations d'abondance des protéines Hsp70 et Hmox-1*

Au point précédent, nous avons montré que le cuivre pouvait induire une augmentation de l'abondance en ARNm des gènes codants pour Hsp70, Hmox-1, Prp et MT2A. Nous nous sommes ensuite intéressés aux variations de l'abondance protéique de Hsp70 et Hmox-1 dans le modèle d'exposition des fibroblastes au CuSO<sub>4</sub> (**Fig. IV.2.2**). Nous avons étudié des variations d'abondance de ces protéines après 1, 3, 9, 24, 48 et 72 h après la fin de l'exposition au CuSO<sub>4</sub>. L'abondance en  $\alpha$ -tubuline a été utilisée comme niveau de



référence. De manière générale, nous observons une absence des protéines Hmox-1 et Hsp70, lorsque les cellules n'ont pas été exposées au cuivre.

La protéine Hmox-1 a été détectée dans les lysats protéiques provenant des cellules WI-38 exposées au  $\text{CuSO}_4$ , entre 1 h et 24 h après la fin de l'exposition. L'abondance de cette protéine semble diminuer en fonction du temps après la fin de l'exposition au  $\text{CuSO}_4$ . En effet, son abondance est détectable de manière décroissante à 1, 3, 9, et 24h suivant l'exposition au  $\text{CuSO}_4$ , et n'est plus détectable après 48 et 72 h.

L'abondance relative de Hsp70 semble quant à elle augmenter entre 1 h et 9 h après l'incubation. Cependant, ces résultats montrent aussi une diminution de son abondance, 72 h après la fin de l'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ .

Ces résultats semblent montrer, dans les fibroblastes WI-38, une induction transitoire et spécifique de l'abondance protéique de Hmox-1 et de Hsp70 par le cuivre dans notre modèle. Ces résultats coïncident également en amplitude et en temps avec les observations effectuées au niveau de l'abondance relative en ARNm de ces mêmes protéines.

Nous avons également essayé, de manière non fructueuse, de mettre en évidence une augmentation d'abondance relative par western blot pour les protéines MT2A et PrP. Les problèmes rencontrés lors de la réalisation des expériences semblent être spécifiques à chacune de ces deux protéines. En effet, en ce qui concerne la protéine MT2A, il semblerait que l'anticorps utilisé manque de spécificité et ne nous permettrait pas de mettre en évidence, de manière claire, toute augmentation d'abondance relative de cette protéine, du moins par western blot. Des expériences supplémentaires, nécessitant d'une part des mises au point plus approfondies et, d'autre part, l'utilisation d'un ou de plusieurs autres anticorps plus spécifiques de MT2A seront nécessaires. Dans le cas de la protéine PrP, les mises au point récentes, au sein du laboratoire, ont montré que l'absence de résultats était la conséquence probable de l'utilisation d'un tampon d'extraction non approprié.

La détection par immunofluorescence a également été utilisée afin d'évaluer l'abondance et la localisation subcellulaire des protéines Hmox-1, Hsp70, PrP et MT2A suite à une exposition des cellules WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ . Lors de ces manipulations, le ToPro-3 a été utilisé afin de mettre en évidence et de visualiser les noyaux cellulaires.

La **figure IV.2.3** montre les résultats de la détection par immunofluorescence de la protéine Hmox-1 directement après la fin de l'exposition des cellules WI-38 au cuivre. Une présence légère de la protéine Hmox-1 au niveau des cellules WI-38 est observée pour les conditions contrôles qui n'ont pas été exposées au  $\text{CuSO}_4$ , et également pour les cellules exposées au  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  à une concentration de 600  $\mu\text{M}$ . La protéine Hmox-1 est aussi détectée faiblement à des concentrations en  $\text{CuSO}_4$ , entre 50 à 200  $\mu\text{M}$ . Par contre, ces résultats montrent une abondance fortement augmentée de la protéine Hmox-1 à des concentrations de 400 et 600  $\mu\text{M}$  en  $\text{CuSO}_4$ . A ces concentrations, Hmox-1 est abondamment localisée dans le cytoplasme, et, dans une moindre mesure, dans le noyau cellulaire.

La détection d'Hsp70 a été également évaluée au sein des cellules WI-38 par immunofluorescence, cette fois directement et 24 h après exposition de 16 h au  $\text{CuSO}_4$ . La détection par immunofluorescence réalisée directement après la fin de l'exposition (**Fig. IV.2.4**) au  $\text{CuSO}_4$  ne montre pas de différence claire d'abondance de la protéine Hsp70 en fonction de la concentration en  $\text{CuSO}_4$  à laquelle les cellules WI-38 ont été exposées. 24 h



après le stress (**Fig. IV.2.5**), Hsp70 est faiblement détectée en absence de  $\text{CuSO}_4$  ainsi qu'en présence de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  600  $\mu\text{M}$ . Une augmentation marquée de l'abondance de Hsp70 au sein du cytoplasme a été observée suite à l'exposition des cellules WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ , et ce, à partir de la plus faible concentration égale à 50  $\mu\text{M}$ . Cette augmentation est d'autant plus marquée aux concentrations les plus élevées en  $\text{CuSO}_4$ , 400 et 600  $\mu\text{M}$ . Les résultats de ces détectations par immunofluorescences réalisées directement et 24 h après la fin de l'exposition au  $\text{CuSO}_4$  recoupent les observations faites par western blotting, où la Hsp70 était faiblement détectable directement à la fin de l'exposition des cellules WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ , avant de voir augmenter son abondance à 9 h et 24 h après la fin de l'exposition au  $\text{CuSO}_4$ .

La **figure IV.2.6** montre les résultats de la détection par l'immunofluorescence de la protéine PrP, réalisée après 2 h et 16 h d'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ . Une abondance relativement élevée de PrP est observée quelle que soit la condition ou le temps étudié, que ce soit en présence ou en absence de  $\text{CuSO}_4$  ainsi qu'en présence de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  600  $\mu\text{M}$ . Ces résultats ne montrent donc aucune induction accrue de la protéine PrP suite à l'exposition des cellules WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ .

Le fait de ne pas avoir pu mettre en évidence d'induction accrue de la protéine PrP après exposition au cuivre par rapport aux cellules contrôles, pourrait hypothétiquement être attribué à plusieurs causes. D'une part, il s'agit peut être de la présence d'un mécanisme global de réponse cellulaire à un stress, ou Prp est induite suite à la culture spécifique des cellules sur couvre-objet, pour toutes les conditions expérimentales testées. D'autre part, et au vu du manque de résultat obtenu par western blot, un marquage non spécifique par l'anticorps pourrait être à l'origine du problème rencontré. Considérant le fait que nous avons montré une augmentation d'abondance relative en ARNm pour cette même protéine, la piste d'un problème spécifique de révélation de la protéine PrP semble favorisée. Il serait par ailleurs intéressant de réitérer nos expériences en utilisant un autre anticorps.

La détection par immunofluorescence permettant la mise en évidence de MT2A a été réalisée après 2 h et 16 h d'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$  (**Fig. IV.2.7**). 2 h après l'exposition, une abondance relativement faible de MT2A a été observée en absence de  $\text{CuSO}_4$  ainsi qu'en présence de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  600  $\mu\text{M}$ . Par contre, l'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$  engendre une augmentation assez marquée de l'abondance de la protéine MT2A. A 16 h après la fin de l'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ , aucune différence notable n'a été mise en évidence en ce qui concerne l'abondance de la protéine MT2A dans ces différentes conditions.

### *2.3. Conclusions*

Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'abondance protéique de Hmx-1 et Hsp70 par western blot. Cependant, ces variations d'abondance semblent être dépendantes du temps, avec une diminution d'abondance relative de Hmx-1 en fonction du temps, ce qui est en accord avec nos observations selon lesquelles l'abondance relative en ARNm de Hmx-1 augmentait directement à la fin de l'exposition des WI-38, mais pas à 24 h et 72 h. L'augmentation en abondance relative de MT2A, tout comme celle de Hmx-1 et Hsp70 a été montrée en immunofluorescence.



Les résultats obtenus pour la protéine Hsp70 semblent être comparables à ceux obtenus par l'équipe de Seok. Cette équipe a en effet mis en évidence, via un système rapporteur à l'EGFP fusionnée à l'Hsp70, une augmentation de l'abondance relative de cette protéine en réponse à une exposition au cuivre à la fois *in vitro* dans des cellules CHSE 214 (Chinook Salmon Embryo) et *in vivo* chez le poisson zèbre *Danio rerio* (Seok *et al.*, 2006).

Suite à nos expériences, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence une variation de l'abondance des protéines MT2A et Prp par western blot, et de Prp en immunofluorescence. Cependant, le fait d'avoir démontré une augmentation marquée de l'abondance relative en ARNm pour ces deux protéines et l'étude récente de Varela-Nallar qui a montré une induction génique et protéique de la Prp dans des cellules neuronales PC12 suite à l'exposition de ces cellules au cuivre (Varela-Nallar *et al.*, 2006) suggèrent que le manque d'observations suite à nos expériences pourrait être attribué à des problèmes techniques. La mise en évidence par western blot et immunofluorescence nécessite donc des mises au point supplémentaires.

De manière générale, nos résultats montrent une induction au niveau de l'abondance relative en ARNm, et, dans une moindre mesure, au niveau protéique, de gènes connus pour être modulés par le cuivre suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au cuivre. Dès lors, il semble intéressant de savoir si ces gènes modulés par le cuivre sont également surexprimés dans un modèle connu de sénescence induite prématurément par les stress chez ces mêmes fibroblastes. Nous avons dès lors étudié l'expression des gènes MT2A, PrP, Hmox-1 et Hsp70 dans un modèle de sénescence induite prématurément par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, plusieurs études ont démontré qu'une exposition à une concentration sub létale en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entraîne l'apparition de la sénescence cellulaire, notamment chez les fibroblastes WI-38 (de Magalhaes *et al.*, 2004; Fripiat *et al.*, 2002).

### 3. Expression des gènes MT2A, Prp, Hmox-1 et Hsp70 lors de la sénescence induite prématurément par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

L'étude de l'expression des gènes MT2A, PrP, Hmox-1 et Hsp70 a été réalisée au sein de cellules WI-38 exposées pendant deux heures à une concentration de 100  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. IV.3). Il est important de souligner que des travaux précédents au laboratoire ont démontré qu'une exposition de 2 h à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à une concentration de 100  $\mu$ M était capable d'induire une sénescence prématurée de ces fibroblastes WI-38. L'abondance relative en ARNm de ces gènes a été évaluée 24 h après la fin de l'exposition des cellules à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'abondance de l'ARNm de 23 kDa a été utilisée comme matériel de référence. De manière générale, l'abondance relative en ARNm de ces gènes régulés par le cuivre est augmentée suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, avec une augmentation d'un facteur 2,5 à 3 pour l'abondance relative en ARNm de MT2A, Hsp70 et PrP et d'un facteur d'1,8 pour l'abondance relative en ARNm de Hmox-1.

Nos résultats confirment donc l'hypothèse selon laquelle les gènes d'intérêt, régulés par le cuivre, peuvent être surexprimés dans des conditions de sénescence cellulaire induite prématurément. Au vu de ces résultats, il semble intéressant dès lors d'étudier l'apparition des différents biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>.



Il faut cependant souligner que d'autres expériences réalisées en parallèles, au sein du laboratoire, ont montré que l'expression de ces gènes était surexprimée dans plusieurs modèles de SIPS, mais également en sénescence répliquative chez les fibroblastes WI-38. Cela suggère que MT2A, Prp, Hsp70 et Hmox-1 semblent être impliqués dans la sénescence cellulaire de manière générale.

#### 4. Etude des biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>

Nous avons étudié après 16 h exposition au CuSO<sub>4</sub> à 500 µM de fibroblastes WI-38, l'apparition de biomarqueurs de la sénescence tels le changement de morphologie cellulaire, l'activité β-galactosidase associée à la sénescence, l'arrêt de la prolifération cellulaire, l'abondance relative en ARNm des gènes associés à la sénescence.

La **Figure IV.4.1A** montre des micrographies de fibroblastes WI-38, 24 h après la fin de l'exposition au CuSO<sub>4</sub> et les compare à des fibroblastes WI-38 non exposés au CuSO<sub>4</sub>. De manière frappante, nous observons une densité cellulaire beaucoup plus faible pour les cultures de fibroblastes WI-38 suite à l'expositions au CuSO<sub>4</sub>. La morphologie cellulaire semble également être affectée par l'exposition des cellules au cuivre. En effet, comparé aux cellules contrôles, les cellules exposées au CuSO<sub>4</sub> montre une surface cellulaire légèrement plus étalée.

Ensuite, la proportion de cellules présentant une activité β-galactosidase associée à la sénescence (SA-βgal) après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub> a été évaluée (**Fig. IV.4.1.B**). Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus pour des fibroblastes WI-38 non exposés au cuivre ou exposées au Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 500 µM. De manière claire, le pourcentage de cellules présentant une activité SA-βgal est largement supérieure dans les cellules exposées au CuSO<sub>4</sub> par rapport aux conditions contrôles. Cette expérience démontre donc un effet du cuivre sur l'activité SA-βgal, typique des cellules sénescents.

Le potentiel prolifératif des fibroblastes WI-38 a été estimé, après l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>, en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée au sein de l'ADN de ces cellules (**Fig. IV.4.1.C**). Une forte diminution a été observée après exposition au CuSO<sub>4</sub>, par rapport aux cellules non exposées ou exposées au Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, démontrant ainsi l'impact de l'exposition au CuSO<sub>4</sub> sur la prolifération cellulaire.

Ces résultats sont très similaires à ceux observés dans la plupart des modèles de sénescence de fibroblastes humains induite par divers agents stressants. En effet, il a été montré dans plusieurs études que lorsque l'on soumet des cellules à des concentrations sublétales de *t*-BHP (Toussaint *et al.*, 1992), d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fripiat *et al.*, 2002), d'éthanol (Dierick *et al.*, 2002) ou à des doses sublétales de rayons ultraviolets (UVB) (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005), on observe une augmentation de cellules présentant une activité SA-βgal ainsi qu'une diminution significative de la prolifération cellulaire. L'induction de ces biomarqueurs après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub> suggère donc un lien entre le cuivre et la sénescence au sein de ces cellules. Au vu de ces observations, il semble donc intéressant d'évaluer le niveau d'expression de gènes connus pour être associés à la sénescence après exposition au CuSO<sub>4</sub>.



Nous avons donc évalué l'abondance relative en ARNm de gènes dont une augmentation d'abondance est connue pour être associée à la sénescence cellulaire, à savoir *apoJ*, *CTGF*, *IGFBP-3*, *p21<sup>WAF-1</sup>*, *TGFβ-1* et la *fibronectine* (Fig. IV.4.2). L'extraction d'ARN a été réalisée à 48 h et 72 h après la fin de l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus à partir des fibroblastes WI-38 non exposés. A 48 h, aucune différence notable d'abondance relative en ARNm de CTGF et d'IGFBP-3 n'a pu être mise en évidence entre les cellules contrôles et les cellules exposées au CuSO<sub>4</sub>. L'abondance relative de *p21<sup>WAF-1</sup>*, *TGFβ-1* et de la fibronectine était quant à elle augmentée d'un facteur 1,3 à 1,5. La plus grande augmentation d'abondance relative, d'un facteur 2, a été observée pour l'ApoJ. A 72 h, l'abondance relative en ARNm de CTGF et d'IGFBP-3 n'est pas différente entre les cellules contrôles et les cellules exposées au CuSO<sub>4</sub>. L'abondance relative en ARNm de l'ApoJ et de *P21<sup>WAF-1</sup>* augmente d'un facteur 1,5. L'augmentation d'abondance relative la plus élevée, d'un facteur 2,4, est observée pour *TGFβ-1*.

Aucune différence d'abondance relative en ARNm de IGFBP3 n'a pu être mise en évidence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. Pourtant, l'équipe de Debacq-Chainiaux a montré récemment une surexpression de IGFBP3 en sénescence répliquative et en SIPS induite par l'éthanol ou le *t*-BHP chez des fibroblastes humains (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2008). Cette même équipe a notamment observé une surexpression de IGFBP3 après stimulation des cellules au *TGFβ-1*.

Des études complémentaires ont souligné le fait que IGFBP3 pouvait être régulé à la fois par des dommages à l'ADN et par le *TGFβ-1* (Martin and Baxter, 1991) et qu'une stimulation de fibroblastes humains au *TGFβ-1*, pouvait induire une surexpression de IGFBP3 (Kamanga-Sollo *et al.*, 2003; Kveiborg *et al.*, 2001). Il semblait donc logique d'observer une augmentation de l'abondance relative en ARNm de IGFBP3.

Cependant, une étude récente a démontré un lien entre la protéine Prion (Prp) et la voie de signalisation du *TGFβ-1* (Wurm and Wechselberger, 2006). De manière plus précise, la surexpression de la PrP altère l'activité de la voie de signalisation du *TGFβ-1*. Dans le cadre de ce travail nous observons une augmentation marquée de l'abondance relative en ARNm de la Protéine Prion après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. Ceci pourrait donc modifier la voie de signalisation du *TGFβ-1*, lui-même lié la surexpression d'IGFBP3. Considérant cette hypothèse, le fait de ne pas observer d'augmentation de l'abondance relative en ARNm de IGFBP3 après exposition des fibroblastes au CuSO<sub>4</sub> semble envisageable.



## 5. Implication de la voie du TGF $\beta$ -1 dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après exposition au CuSO $_4$

Le TGF $\beta$ -1 joue un rôle dans l'apparition de plusieurs marqueurs de sénescence cellulaire, tels les changements de morphologie, une augmentation des cellules présentant une activité  $\beta$ -galactosidase associé à la sénescence et une augmentation de l'abondance des gènes associés à la sénescence dans différents modèles de SIPS (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2005; Fripiat *et al.*, 2001a). De manière plus précise, l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-TGF $\beta$ -1 bloque l'apparition, dans les mêmes modèles de SIPS, de ces biomarqueurs de sénescence. Le rôle de TGF $\beta$ -1 ainsi que l'implication potentielle du cuivre dans ces mécanismes nous ont amené à étudier la modulation de l'expression des gènes régulés par le cuivre suite à la stimulation des fibroblastes WI-38 avec du TGF $\beta$ -1.

### 5.1. Etude de l'expression de MT2A, Prp, Hmox-1 et Hsp70 après stimulation des fibroblastes WI-38 avec le TGF $\beta$ -1

L'étude de l'expression de MT2A, Prp, Hmox-1 et Hsp70 a été réalisée au sein de fibroblastes WI-38 exposés pendant 3 jours à une concentration de 5 ng/ml en TGF $\beta$ -1 (**Fig IV.5.1**). L'abondance relative en ARNm de MT2A, Prp, Hmox-1 et Hsp70 a été évaluée à 0 h et 24 h après la fin de la stimulation des fibroblastes WI-38 au TGF $\beta$ -1. Les résultats obtenus ont été normalisés et comparés à ceux obtenus dans des fibroblastes WI-38 non stimulés, pour chaque transcrite respectif. L'abondance relative en ARNm du gène Hsp70 n'augmente pas par rapport au contrôle. Pour MT2A, Prp et Hmox-1, une augmentation d'abondance relative est observée directement (entre 1,4 et 1,6 fois) et à 24 h (entre 1,5 et 2,3 fois) après la fin de la stimulation avec le TGF $\beta$ -1. Cette augmentation semble être plus forte, pour ces 3 transcrits à 24 h après la fin de la stimulation. Ces résultats montrent donc une augmentation d'abondance relative en ARNm des gènes modulés par le cuivre MT2A, PrP et Hmox-1 suite à la stimulation avec le TGF $\beta$ -1 des fibroblastes WI-38.

Au vu de nos résultats d'abondance relative en ARNm de Hsp70 après stimulation des fibroblastes WI-38 avec le TGF $\beta$ -1, une hypothèse envisageable serait une induction transitoire de celle-ci. En effet, dans notre modèle d'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO $_4$ , nous avons montré une augmentation de l'abondance relative en ARNm de Hsp70 directement après la fin de l'exposition. Dans ce cas de figure, cette augmentation n'est plus détectable 24 h et 72 h après la fin de l'exposition. Selon ce même raisonnement, il est probable que l'augmentation de l'abondance relative en ARNm de Hsp70 ne soit visible que directement au début de la stimulation avec le TGF $\beta$ -1. Nos expériences ayant été réalisées au troisième jour de stimulation, il se pourrait que l'abondance relative en ARNm de Hsp70 soit revenue à son niveau basal. Il serait donc intéressant de répéter cette expérience pour des durées plus courtes de stimulation avec le TGF $\beta$ -1.



### *5.2. Abondance relative de Hsp70 et Hmox-1 après incubation des fibroblastes WI-38 avec un anticorps neutralisant le TGFβ-1 en présence de CuSO<sub>4</sub>*

Nous avons étudié l'effet d'un anticorps neutralisant le TGFβ-1 sur l'abondance relative des protéines Hsp70 et Hmox-1 dans les fibroblastes WI-38 exposés au CuSO<sub>4</sub> à 500 μM pendant 16 h (**Fig IV.5.2**).

Pour ce faire, les cellules ont été incubées avec du CuSO<sub>4</sub> en présence ou non d'une concentration de 3 μg/ml d'anticorps neutralisant le TGFβ-1. A 1 h et 3 h après la fin des 16 h exposition au CuSO<sub>4</sub>, nous avons évalué, par western blotting, les changements d'abondance de Hsp70 et Hmox-1. Nos résultats confirment que ces deux protéines sont induites spécifiquement par le CuSO<sub>4</sub>. Hsp70 ou Hmox-1 n'ont pas été détectées en absence de CuSO<sub>4</sub> ou en présence de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Une abondance relative plus faible de Hsp70 et Hmox-1 semble être observée suite à l'addition d'un anticorps neutralisant le TGFβ-1, à 1 h mais également à 3 h après la fin de l'exposition au CuSO<sub>4</sub>.

### *5.3. Conclusions*

Nous avons donc observé une augmentation de l'abondance relative en ARNm des transcrits MT2A, PrP et Hmox suite à la stimulation des fibroblastes WI-38 avec le TGFβ-1, mais nous n'avons pas observé de variation de l'expression du gène Hsp70 aux temps choisis. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons montré une induction transitoire de cette protéine notamment après l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. Dès lors, il est probable que l'augmentation de l'abondance relative en ARNm de Hsp70 ne soit visible que directement au début de la stimulation avec le TGFβ-1.

En ce qui concerne l'utilisation d'un anticorps neutralisant le TGFβ-1, nous avons observé une légère diminution de l'abondance relative des protéines Hsp70 et Hmox-1. Cependant, ces résultats doivent être confirmés pour l'ensemble des protéines étudié dont l'expression est régulée par le cuivre, à la fois au niveau protéique mais aussi au niveau de l'abondance relative en ARNm.

## **6. Causes potentielles de l'apparition de biomarqueurs de la sénescence suite à l'exposition de fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>**

Au vu des résultats obtenus lors de l'étude sur l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>, et de l'implication potentielle du TGFβ-1 dans l'induction de ceux-ci, il est dès lors intéressant d'étudier les différents mécanismes cellulaires sous-jacents pouvant expliquer l'apparition de ces biomarqueurs de la sénescence.

Sachant que le cuivre est capable de jouer un rôle direct dans la production de ROS au sein de la cellule (Blander *et al.*, 2003a; Lu and Finkel, 2008), nous avons évalué la production radicalaire suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. En effet, le cuivre possède la



capacité de passer d'un état stable oxydé à un état instable réduit. La transition entre l'état oxydé et réduit du cuivre peut générer des espèces réactionnelles de l'oxygène tels les radicaux superoxydes et hydroxyles (Gutteridge, 1985; Shi and Dalal, 1992). Si ces espèces réactionnelles de l'oxygène ne sont pas détoxifiées de manière efficace, il en résulte des dommages des composants cellulaires comme par exemple des dommages oxydatifs des lipides, des protéines, de l'ADN et d'autres biomolécules (Gutteridge, 1985). C'est pourquoi, nous avons également évalué les dommages à l'ADN suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ , comme étant un des mécanismes cellulaires probable pouvant également expliquer l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après exposition au  $\text{CuSO}_4$ .

### *6.1. Production radicalaire suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au $\text{CuSO}_4$*

Une manière d'évaluer si des stress oxydatifs ont lieu suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ , est d'utiliser la sonde DCF sensible à certaines espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (**Fig. IV.6.1.1**). Cette sonde permet de mettre en évidence en générant de la fluorescence, la présence de stress oxydatifs. Les cellules ont été pré-incubées avec la sonde pendant 30 min avant l'ajout dans le milieu cellulaire de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (500  $\mu\text{M}$ ),  $\text{CuSO}_4$  (500  $\mu\text{M}$ ) ou  $\text{H}_2\text{O}_2$  (500  $\mu\text{M}$ ). Nos résultats ont été normalisés à la condition contrôle, constituée par des cellules non exposées. La lecture en fluorimétrie a été réalisée après 0, 15, 30, 60 et 120 min suite à l'exposition des cellules au  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  et à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . De manière générale, aucun stress oxydatif n'a été observé après l'exposition au  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ou au  $\text{CuSO}_4$ , et ce quel que soit le temps de mesure après exposition. De manière contrastée, l'exposition à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  génère clairement une oxydation de la sonde DCF.

Plusieurs études ont cependant mis en évidence en utilisant la sonde DCF, la présence de stress oxydatifs induit par le cuivre dans différents modèles de cellules de mammifère *in vitro* (Orhan *et al.*, 2006; Bopp *et al.*, 2008). Ceci suggère que des mises au point supplémentaires sont nécessaires afin de mettre en évidence la présence de stress oxydatifs par utilisation de la sonde DCF dans les fibroblastes WI-38 exposés au  $\text{CuSO}_4$ .

De plus, nous avons montré précédemment une augmentation marquée d'abondance relative en ARNm et de l'abondance protéique de Hmx-1 après exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ . Ceci suggère de manière indirecte la présence de stress oxydatifs après l'exposition des cellules au cuivre. En effet, Hmx-1 est une protéine connue pour être induite par le stress oxydatif et dont l'expression est augmentée en réponse à différents stimuli associés au stress oxydatif (Ryter *et al.*, 2002). L'augmentation de son expression en réponse à des stress divers, démontre le rôle central de cette protéine dans la cytoprotection contre les stress oxydatifs (Otterbein and Choi, 2000).

La sonde DCF n'étant peut être pas le meilleur moyen de détecter un stress oxydatif, et sachant que la protéine Hmx-1 est induite par l'exposition au cuivre, nous avons décidé, de manière indirecte, d'utiliser le Trolox afin de voir si ce dernier pouvait protéger contre l'induction potentiel stress oxydatifs dûs à la présence de  $\text{CuSO}_4$  dans le milieu cellulaire des fibroblastes WI-38 (**Fig. IV.6.1.2**). Le Trolox est une molécule synthétique analogue à la vitamine E et qui est connu pour protéger contre les stress oxydatifs. Nous avons exposé les fibroblastes au  $\text{CuSO}_4$  en présence ou en absence de Trolox. Nous avons évalué ensuite l'abondance relative des protéines Hmx-1 et Hsp70. Quelle que soit la protéine étudiée, nous avons observée une diminution de l'abondance relative de ces protéines en présence de Trolox.



Ces résultats, qui méritent confirmation, suggèrent qu'une telle diminution ne serait pas possible sans la présence d'un stress oxydatif suite à une exposition au  $\text{CuSO}_4$ . Ces résultats suggèrent donc, de manière indirecte, la présence d'un stress oxydatif en conséquence de l'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ .

### *6.2. Evaluation des dommages à l'ADN suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au $\text{CuSO}_4$*

Parmi les différents types de dommages oxydatifs, les cassures double brin au niveau de l'ADN peuvent être détectées étant donné qu'elles induisent la phosphorylation de l'histone H2AX. L'histone Phospho-H2AX (P-H2AX) a été détecté par immunofluorescence en utilisant l'anticorps anti-phospho-histone-2AX suite à une exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$  à 500  $\mu\text{M}$  pendant 16 h (**Fig. IV.6.2**). Lors de ces manipulations, le ToPro-3 a été utilisé afin de visualiser les noyaux cellulaires. L'Etoposide a été utilisé comme contrôle positif, pour sa capacité à engendrer des dommages à l'ADN et donc une phosphorylation de H2AX. Les résultats montrent, pour les conditions de non exposition au  $\text{CuSO}_4$  et d'exposition au  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , une légère détection de P-H2AX. Suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au  $\text{CuSO}_4$ , nous voyons clairement une augmentation de la fluorescence au niveau des noyaux cellulaires. Cette augmentation de fluorescence se rapproche de celle observée, bien que dans une moindre mesure, de celle détectée dans les cellules ayant été incubées avec de l'Etoposide (contrôle positif). Ces premiers résultats suggèrent donc que des dommages à l'ADN sont générés suite à la présence de cuivre dans le milieu de culture cellulaire des fibroblastes WI-38.

### *6.3. Conclusion*

Nous avons démontré la présence de stress oxydatifs de manière indirecte par l'utilisation du Trolox, connu pour protéger contre les stress oxydatifs. En effet la diminution d'abondance relative des protéines Hsp70 et Hmox-1, tous deux étant de très bons indicateurs de stress oxydatifs, suggère l'apparition d'une production radicalaire au sein des cellules exposées au  $\text{CuSO}_4$ . Nous avons également démontré la phosphorylation de H2AX, trahissant ainsi la présence de dommages à l'ADN suite à l'exposition au  $\text{CuSO}_4$ . Ces résultats nous permettent donc de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents responsables de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence des fibroblastes WI-38 après exposition au  $\text{CuSO}_4$ .



## Conclusions et perspectives

Lors de ce mémoire, nous nous sommes intéressés à l'implication du cuivre dans les mécanismes de sénescence chez les fibroblastes de poumon foetal humain WI-38. Nous avons pour cela essayé de mettre en évidence l'existence d'une relation entre le cuivre et la sénescence cellulaire. Cette hypothèse repose sur différentes observations qui sont la mise en évidence d'un lien entre le cuivre et le vieillissement chez le champignon *Podospora anserina* (Borghouts and Osiewacz, 1998b; Borghouts *et al.*, 2001b), le fait que de nombreuses protéines fondamentales au métabolisme lié au cuivre sont conservées d'une espèce à l'autre (Mocchegiani *et al.*, 2001, Grosvik et Goksyor 1996, Slebos *et al.*, 2003) et le fait que certains mécanismes liés au vieillissement sont hautement conservés à travers l'évolution (Barbieri *et al.*, 2003). De nombreuses étapes ont été réalisées au cours de ce mémoire et de nombreuses observations nous permettent d'établir qu'il existe un lien entre le cuivre et les mécanismes de la sénescence cellulaire chez les fibroblastes de poumon foetal humain WI-38.

### 1. Mise au point d'un modèle d'exposition des fibroblastes WI-38 au sulfate de cuivre, CuSO<sub>4</sub>

La première étape de ce travail fut de mettre au point un modèle d'exposition au cuivre. Nous avons choisi de mettre au point un tel modèle sur des fibroblastes de poumon foetal humain WI-38 car ils représentent le type cellulaire le plus caractérisé pour les mécanismes de la sénescence. En effet, la sénescence répllicative a été observée pour la première fois en 1961 par Hayflick et Moorhead dans ces cellules (Hayflick and Moorhead, 1961) et de nombreux modèles de SIPS ont été mis au point sur celles-ci (T. Pascal *et al.*, 2005). La mise au point d'un modèle d'exposition au cuivre a demandé de nombreuses expériences. En effet, il a été testé différents sels de cuivre (CuSO<sub>4</sub> et CuCl<sub>2</sub>) et autres sels (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et NaCl), différentes concentrations en sels, différents temps d'incubation (de 2 à 24h), différents pourcentage en sérum (0 à 10%), etc. Nous avons effectué des tests de survie cellulaire (MTT) pour pouvoir déterminer une concentration sublétales pouvant engendrer une surexpression de gènes connus pour être régulés par le cuivre et des marqueurs de la sénescence dans les fibroblastes WI-38. Le modèle d'exposition au cuivre mis au point est le suivant : les fibroblastes WI-38 sontensemencés 24h avant d'être exposés à 500 µM de CuSO<sub>4</sub> pendant 16h.

### 2. Effets de l'exposition de fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>

La seconde étape de ce travail fut d'évaluer les changements d'abondance relative en d'ARNm de gènes connus pour être régulés par le cuivre ainsi que les variations d'abondance protéique des protéines codées par ces gènes, et ce, à différents temps après l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>.

Les différentes expériences effectuées démontrent une augmentation de l'abondance relative en ARNm des gènes étudiés, à savoir MT2A, Hsp70, PrP et Hmox-1, prouvant ainsi l'induction de ces gènes par le cuivre après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature, où l'induction des gènes codant pour MT2A, Hsp70 et Hmox-1, étudiés lors de ce travail, a été observée ponctuellement dans le



temps et non en cinétique dans des cellules HepG2 suite à une exposition au cuivre (Song et Freedman, 2005). Il a été montré que le cuivre pouvait induire l'expression de la PrP dans les neurones de rat (Bellingham *et al.*, 2008) mais très peu de choses sont connues à ce propos dans les cellules humaines. Nous avons donc montré dans ce mémoire que le cuivre induisait bien une surexpression de ces gènes et nous avons une idée de la cinétique.

Du point de vue de l'abondance protéique, nous avons démontré une augmentation de l'abondance relative des protéines Hmox-1 et Hsp70 par western blot et de MT2A, Hmox-1 et Hsp70 en immunofluorescence. Nos résultats montrent majoritairement, et de manière intéressante une induction transitoire de gènes connus pour être régulés par le cuivre, tant au niveau des transcrits qu'au niveau protéique.

Suite à ces observations, certaines perspectives semblent être intéressantes. Premièrement, des expériences supplémentaires par western blotting visant à détecter les protéines MT2A et PrP, nécessitant des mises au point supplémentaires seront nécessaires afin de compléter l'étude. L'utilisation d'un anticorps plus spécifique de MT2A et de la PrP, mais aussi l'utilisation d'un autre tampon d'extraction protéique pour la PrP, semblent être des facteurs clés pour les manipulations ultérieures. En effet, des expériences récentes et réalisées au sein du laboratoire, ont pu mettre en évidence par western blotting une augmentation de l'abondance protéique de PrP, et par la détection en immunofluorescence, une augmentation du signal dans le noyau, dans les fibroblastes exposés au cuivre.

### 3. Expression des gènes codants pour MT2A, PrP, Hmox-1 et Hsp70 lors de la sénescence induite prématurément par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Nous avons ensuite évalué l'expression d'abondance relative en ARNm de ces mêmes gènes dans un modèle de sénescence induite prématurément par l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> afin d'évaluer l'éventuelle surexpression des gènes régulés par le cuivre dans un modèle connu de sénescence induite prématurément par les stress chez les fibroblastes WI-38. Nos observations montrent une augmentation de l'abondance relative en ARNm de ces gènes régulés par le cuivre, MT2A, PrP, Hmox-1 et Hsp70, suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, confirmant ainsi l'hypothèse selon laquelle des gènes régulés par le cuivre peuvent être surexprimés dans des conditions de sénescence cellulaire induite prématurément par un stress. Une étape supplémentaire intéressante serait d'étudier les variations d'abondance protéique de MT2A, PrP, Hmox-1 et Hsp70 à différents temps après l'exposition à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Des expériences réalisées en parallèle au sein du laboratoire ont pu mettre en évidence une augmentation de l'abondance en ARNm de ces gènes - et donc confirmer les résultats obtenus - dans d'autres modèles de SIPS, par exemple les modèles de SIPS suite à des expositions répétées au *t*-BHP ou à l'éthanol. D'autres expériences, réalisées également au sein du laboratoire, ont pu mettre en évidence une augmentation de l'abondance en ARNm de ces gènes dans les cellules en sénescence répliquative (après de nombreux passages en culture) par rapport à des cellules jeunes (très peu de passages en culture). Ces dernières observations ont été réalisées dans deux types cellulaires, des fibroblastes de derme humain (FS) et des fibroblastes de poumon foetal humain WI-38. Notons que ces gènes sont aussi surexprimés lorsque les fibroblastes du derme (FS) ont été exposés de manière répétée aux UVB.



Le fait que ces gènes connus pour être régulés par le cuivre sont surexprimés en sénescence répllicative et dans tous les modèles de SIPS mis au point au sein du laboratoire, nous permet d'établir une hypothèse selon laquelle ces gènes et peut-être le cuivre lui-même seraient impliqués dans la sénescence cellulaire.

#### 4. Etude des biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>

Au vu de l'augmentation d'abondance relative des gènes régulés par le cuivre dans un modèle de stress induit prématurément à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et dans les autres modèles, nous nous sommes demandés si une exposition avec du cuivre pouvait induire l'apparition de différents biomarqueurs de la sénescence. Pour ce faire, et suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>, nous avons suivi la morphologie cellulaire, la proportion de cellules présentant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, la prolifération cellulaire et l'induction de gènes caractéristiques de la sénescence cellulaire.

Les résultats obtenus sont en accord avec les observations faites dans la plupart des modèles de sénescence induite prématurément par divers agents stressant chez les fibroblastes humains. En effet, suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>, nous avons observé une morphologie cellulaire typique de la sénescence, une augmentation marquée du pourcentage de cellules présentant une activité  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence, et une forte diminution du potentiel prolifératif. Ces premières observations vont dans le sens qu'une exposition avec CuSO<sub>4</sub> peut induire l'apparition de biomarqueurs de la sénescence.

En ce qui concerne l'induction de gènes caractéristiques de la sénescence, les résultats obtenus semblent un peu moins facilement interprétables. En effet, nous observons une augmentation de l'abondance relative en ARNm de gènes codant pour ApoJ, p21<sup>WAF-1</sup>, TGF $\beta$ -1 et la fibronectine mais pas pour les gènes qui codent pour CTGF et IGFBP3. Cependant, bien qu'une stimulation de fibroblastes au TGF $\beta$ -1 peut induire une surexpression de IGFBP3 (Kamanga-Sollo 2003, Kveiborg 2001, Debacq-Chainiaux 2008), la surexpression de la PrP peut également altérer l'activité de la voie de signalisation du TGF $\beta$ -1 (Wurm et Wechselberger 2006). Dans notre modèle nous observons une induction marquée de la PrP après exposition des fibroblastes au CuSO<sub>4</sub>, ce qui pourrait altérer la voie de signalisation du TGF $\beta$ -1 et inhiber la surexpression de IGFBP3. Ce mécanisme de régulation pourrait donc expliquer, en partie, l'absence d'augmentation d'abondance relative en ARNm de IGFBP3 après exposition des fibroblastes au CuSO<sub>4</sub>. Il semble dès lors intéressant, de confirmer ces résultats et d'étudier plus en avant les effets de la PrP sur la voie de signalisation du TGF $\beta$ -1, et de ses conséquences sur l'expression d'IGFBP3 dans le modèle d'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO<sub>4</sub>. Il est également intéressant de souligner qu'une étude récente a démontré que le CTGF est lui aussi régulé par le TGF $\beta$ -1 dans un modèle de sénescence induite prématurément par les UVB (Debacq-Chainiaux, non publié).



## 5. Implication de la voie du TGF $\beta$ -1 dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après exposition au CuSO $_4$

Le fait que le TGF $\beta$ -1 joue un rôle important dans l'apparition de différents marqueurs de la sénescence cellulaire nous a amené à la question suivante : les variations d'expression des gènes codants pour Hsp70, MT2A, PrP et Hmox-1 sont-elles dépendantes du TGF $\beta$ -1 ? Pour répondre à cette question, nous avons donc évalué l'abondance relative en ARNm de ces gènes suite à une stimulation des fibroblastes WI-38 avec du TGF $\beta$ -1.

Nous observons une augmentation de l'abondance relative en ARNm des transcrits MT2A, PrP et Hmox suite à la stimulation des fibroblastes WI-38 avec le TGF $\beta$ -1. Aucune variation de l'expression du gène codant pour Hsp70 n'a été observée aux temps choisis. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous avons montré une induction transitoire de cette protéine notamment après l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO $_4$ . Dès lors, il est probable que l'augmentation de l'abondance relative en ARNm de Hsp70 ne soit visible que directement au début de la stimulation avec le TGF $\beta$ -1. L'étude de la variation d'abondance relative en ARNm des gènes régulés par le cuivre, pour des temps de stimulation avec le TGF $\beta$ -1 plus courts, semblent être une piste à privilégier à l'avenir. Aussi, il serait intéressant de confirmer nos observations en étudiant par Western Blotting les variations de l'abondance protéique dans des conditions similaires. De manière générale, nous observons une augmentation de l'abondance relative en ARNm de gènes connus pour être régulés par le cuivre suite à une stimulation avec le TGF $\beta$ -1.

Nous nous sommes demandés si le TGF $\beta$ -1 jouait un rôle dans l'apparition des variations d'abondance protéique de MT2A, PrP, Hmox-1 et Hsp70 lorsque les fibroblastes WI-38 sont exposés au CuSO $_4$ . Pour cela, nous avons étudié l'effet d'un anticorps neutralisant le TGF $\beta$ -1 sur l'abondance protéique de Hsp70 et Hmox-1. Une légère diminution de l'abondance relative des protéines Hsp70 et Hmox-1 a été détectée, ce qui signifie que le TGF $\beta$ -1 semble jouer un rôle dans l'apparition de ces variations, au moins partiellement. Ces observations ne semblent n'avoir jamais été présentées dans la littérature.

Cependant, ces résultats doivent être confirmés pour l'ensemble des protéines dont l'expression est régulée par le cuivre étudié, à la fois au niveau protéique mais aussi au niveau de l'abondance relative en ARNm. Une perspective supplémentaire intéressante serait d'évaluer l'apparition de biomarqueurs de la sénescence dont l'induction de gènes caractéristiques de la sénescence après exposition des fibroblastes au CuSO $_4$ , en présence ou non d'un anticorps bloquant le TGF $\beta$ -1, afin d'évaluer les éventuels changements d'expression de ces gènes.

## 6. Causes potentielles de l'apparition de biomarqueurs de la sénescence suite à l'exposition de fibroblastes WI-38 au CuSO $_4$

Afin de comprendre les causes potentielles de l'apparition, observée lors de cette étude, de biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO $_4$ , nous avons évalué la présence de stress oxydatifs et de dommages à l'ADN.



Les stress oxydatifs ont été évalués grâce à la sonde DCF, sensible aux espèces radicalaires dérivées de l'oxygène. Nos résultats ne montrent aucune oxydation de la sonde suite à l'exposition au CuSO<sub>4</sub> des fibroblastes WI-38. L'utilisation de la sonde DCF n'étant probablement pas le meilleur moyen de mettre en évidence la présence de stress oxydatifs, il serait intéressant de déterminer si des stress oxydatifs sont engendrés par le cuivre via une autre technique de détection. Vu l'augmentation de l'abondance protéique de la Hmox-1, qui est connue pour jouer un rôle de protection contre les stress oxydatifs, nous pensons que le cuivre engendre un stress oxydatif dans notre modèle d'exposition au CuSO<sub>4</sub>.

Nous avons mis au point un moyen indirect de mettre en évidence l'existence d'un éventuel stress oxydatif grâce à l'utilisation d'un antioxydant. Nous avons incubé les cellules avec un antioxydant connu, le Trolox, afin de voir si ce dernier pouvait protéger contre le potentiel stress oxydatif dû à l'exposition au CuSO<sub>4</sub> des fibroblastes WI-38. En présence de Trolox, nous avons observé une diminution de l'abondance relative des protéines Hsp70 et Hmox-1, toutes deux connues pour être induites par des stress et dont l'expression est augmentée suite à un stress oxydatif. Ces résultats suggèrent de manière indirecte, qu'un stress oxydatif est présent lorsque des fibroblastes WI-38 sont exposés au CuSO<sub>4</sub>.

Ce stress oxydatif est peut être responsable de l'apparition de biomarqueurs de la sénescence. Pour démontrer cela, il serait intéressant d'étudier leur apparition suite à une exposition avec du CuSO<sub>4</sub> en présence de Trolox. Nous devrions alors observer une apparition moindre des biomarqueurs de la sénescence si le stress oxydatif joue bien un rôle dans leur apparition.

En ce qui concerne les cassures double brin au niveau de l'ADN, les résultats obtenus en immunofluorescence nous ont permis d'observer de manière indirecte par phosphorylation de l'histone H2AX, une augmentation des dommages à l'ADN dans les fibroblastes WI-38 exposés au CuSO<sub>4</sub>. Ces résultats montrent donc que l'augmentation de la concentration en cuivre dans le milieu de culture cellulaire des fibroblastes WI-38 engendre des dommages à l'ADN.

Ces résultats nous permettent donc de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents responsables de l'apparition des biomarqueurs de la sénescence des fibroblastes WI-38 après exposition au CuSO<sub>4</sub>.

Le cuivre ou plutôt l'accumulation de cuivre dans la cellule pourraient éventuellement jouer un rôle important dans l'apparition de biomarqueurs de la sénescence. En effet, il a été mis en évidence chez *Podospora anserina* que le cuivre s'accumulait dans le cytoplasme des cellules sénescents et que lorsque la concentration en cuivre intracellulaire chutait, l'espérance de vie de ce champignon s'en retrouvait augmentée (Borghouts and Osiewacz, 1998a; Borghouts *et al.*, 2001a). Il serait intéressant de déterminer la concentration en cuivre dans les cellules jeunes, dans les cellules en sénescence répliquative ainsi que dans celles en SIPS suite à différents stress (EtOH, *t*-BHP, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV, CuSO<sub>4</sub>). De nombreuses perspectives pourraient découler de ces observations. Par exemple, si une accumulation de cuivre est observée dans les cellules en sénescence, il serait alors intéressant de bloquer l'entrée du cuivre par exemple en bloquant Ctr1, un transporteur de cuivre, par siRNA et de voir les conséquences de ce blocage sur la concentration intracellulaire en cuivre et sur l'apparition de la sénescence. Nous pourrions alors déterminer si le cuivre joue bel et bien un rôle dans les mécanismes de la sénescence.



## 7. Quelques perspectives générales

De nombreuses études à ce jour ont analysé l'implication du cuivre dans le cadre de plusieurs maladies comme la maladie de Menkes ou encore la maladie de Wilson (Madsen and Gitlin, 2007). La maladie de Wilson est caractérisée notamment par une accumulation excessive de cuivre au niveau du foie et du cerveau (Tao and Gitlin, 2003). Bien que les mécanismes de transport métabolique du cuivre soient relativement bien caractérisés, il serait peut être intéressant d'évaluer un potentiel lien entre cuivre et sénescence dans le cadre de cellules hépatocytaires et neuronales de patients atteints de la maladie de Wilson. En effet, nous avons démontré dans le cadre de ce travail, une induction de certains biomarqueurs de la sénescence après exposition de fibroblastes au  $\text{CuSO}_4$ . Il serait donc intéressant d'examiner l'éventuelle apparition de ces biomarqueurs de sénescence au niveau de cellules hépatiques qui sont caractérisées par une accumulation physiologique en cuivre chez les patients atteints de la maladie de Wilson. De la même manière, nous pourrions également étudier la présence de stress oxydatifs et de dommage à l'ADN au sein de ces mêmes cellules.

Le cuivre semble également jouer un rôle prépondérant dans les maladies neurodégénératives liées à la protéine Prion (PrP), comme par exemple la maladie de Creutzfeldt-Jacob chez l'homme (Desai and Kaler, 2008). Bien que sa fonction biologique n'est pas encore clairement élucidée, la PrP possède dans sa séquence des régions de répétitions octapeptidiques lui conférant la propriété de lier certains métaux bivalents, dont le cuivre, suggérant ainsi qu'elle joue un rôle dans la protection des altérations créées par les métaux (Li *et al.*, 2004).

En effet, de nombreuses études ont démontré un rôle de protection de la PrP contre le stress oxydatif (Brown *et al.*, 2002; Herms *et al.*, 1999). Dans le cadre de ce mémoire, nous avons montré une augmentation d'expression de la PrP après expositions des fibroblastes au  $\text{CuSO}_4$ . Nous avons également démontré indirectement la présence de stress oxydatifs et de dommage à l'ADN suite à cette même exposition. Il serait dès lors intéressant à l'avenir de bloquer l'expression de la PrP, par exemple en utilisant des siRNA, afin d'examiner les conséquences sur l'apparition de stress oxydatifs et de dommages à l'ADN après exposition des fibroblastes au  $\text{CuSO}_4$ .

Dans ce mémoire, nous avons pu mettre en évidence quelques résultats qui montrent que le cuivre peut jouer un rôle dans les mécanismes de la sénescence. Les rôles du cuivre dans l'organisme et surtout dans le vieillissement et les pathologies associées au vieillissement, sont encore méconnus et sans doute sous-estimés. Dans ce mémoire, nous avons ouvert quelques portes intéressantes et il en reste sans doute encore beaucoup à ouvrir...



## Reference List

- Abajian C, Yatsunyk L A, Ramirez B E and Rosenzweig A C (2004) Yeast Cox17 Solution Structure and Copper(I) Binding. *J Biol Chem* **279**: pp 53584-53592.
- Adlard PA and Bush A I (2006) Metals and Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* **10**: pp 145-163.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai E V, Futcher A B, Greider C W and Harley C B (1992) Telomere Length Predicts Replicative Capacity of Human Fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: pp 10114-10118.
- Anisimov VN (2008) [Role of the Growth Hormone-Insulin-Like Growth Factor-1-Insulin System Signaling in Aging and Longevity: Evolutional Aspect]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova* **94**: pp 1092-1109.
- Arnesano F, Balatri E, Banci L, Bertini I and Winge D R (2005) Folding Studies of Cox17 Reveal an Important Interplay of Cysteine Oxidation and Copper Binding. *Structure* **13**: pp 713-722.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Martinelli M, Furukawa Y and O'Halloran T V (2004) The Unusually Stable Quaternary Structure of Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase 1 Is Controlled by Both Metal Occupancy and Disulfide Status. *J Biol Chem* **279**: pp 47998-48003.
- Askwith C and Kaplan J (1998) Iron and Copper Transport in Yeast and Its Relevance to Human Disease. *Trends Biochem Sci* **23**: pp 135-138.
- Atadja PW, Stringer K F and Riabowol K T (1994) Loss of Serum Response Element-Binding Activity and Hyperphosphorylation of Serum Response Factor During Cellular Aging. *Mol Cell Biol* **14**: pp 4991-4999.
- Averbeck NB, Borghouts C, Hamann A, Specke V and Osiewacz H D (2001) Molecular Control of Copper Homeostasis in Filamentous Fungi: Increased Expression of a Metallothionein Gene During Aging of *Podospora Anserina*. *Mol Gen Genet* **264**: pp 604-612.
- Barbieri M, Bonafe M, Franceschi C and Paolisso G (2003) Insulin/IGF-I-Signaling Pathway: an Evolutionarily Conserved Mechanism of Longevity From Yeast to Humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **285**: pp E1064-E1071.
- Beckmann RP, Mizzen L E and Welch W J (1990) Interaction of Hsp 70 With Newly Synthesized Proteins: Implications for Protein Folding and Assembly. *Science* **248**: pp 850-854.
- Bellingham SA, Coleman L A, Masters C L, Camakaris J and Hill A F (2008) Regulation of Prion Gene Expression by Transcription Factors SP1 and MTF-1. *J Biol Chem*.
- Birkaya B and Aletta J M (2005) NGF Promotes Copper Accumulation Required for Optimum Neurite Outgrowth and Protein Methylation. *J Neurobiol* **63**: pp 49-61.
- Blackburn EH (1994) Telomeres: No End in Sight. *Cell* **77**: pp 621-623.



- Blander G, de Oliveira R M, Conboy C M, Haigis M and Guarente L (2003b) Superoxide Dismutase 1 Knock-Down Induces Senescence in Human Fibroblasts. *J Biol Chem* **278**: pp 38966-38969.
- Blander G, de Oliveira R M, Conboy C M, Haigis M and Guarente L (2003a) Superoxide Dismutase 1 Knock-Down Induces Senescence in Human Fibroblasts. *J Biol Chem* **278**: pp 38966-38969.
- Bopp SK, Abicht H K and Knauer K (2008) Copper-Induced Oxidative Stress in Rainbow Trout Gill Cells. *Aquat Toxicol* **86**: pp 197-204.
- Borghouts C, kerschner S and Osiewacz H D (2000a) Copper-Dependence of Mitochondrial DNA Rearrangements in *Podospora Anserina*. *Curr Genet* **37**: pp 268-275.
- Borghouts C, kerschner S and Osiewacz H D (2000b) Copper-Dependence of Mitochondrial DNA Rearrangements in *Podospora Anserina*. *Curr Genet* **37**: pp 268-275.
- Borghouts C and Osiewacz H D (1998b) GRISEA, a Copper-Modulated Transcription Factor From *Podospora Anserina* Involved in Senescence and Morphogenesis, Is an Ortholog of MAC1 in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **260**: pp 492-502.
- Borghouts C and Osiewacz H D (1998a) GRISEA, a Copper-Modulated Transcription Factor From *Podospora Anserina* Involved in Senescence and Morphogenesis, Is an Ortholog of MAC1 in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **260**: pp 492-502.
- Borghouts C, Werner A, Elthon T and Osiewacz H D (2001a) Copper-Modulated Gene Expression and Senescence in the Filamentous Fungus *Podospora Anserina*. *Mol Cell Biol* **21**: pp 390-399.
- Borghouts C, Werner A, Elthon T and Osiewacz H D (2001b) Copper-Modulated Gene Expression and Senescence in the Filamentous Fungus *Podospora Anserina*. *Mol Cell Biol* **21**: pp 390-399.
- Bourgain FM and Katinka M D (1991) Telomeres Inhibit End to End Fusion and Enhance Maintenance of Linear DNA Molecules Injected into the *Paramecium Primaurelia* Macronucleus. *Nucleic Acids Res* **19**: pp 1541-1547.
- Brewer GJ (2007) Iron and Copper Toxicity in Diseases of Aging, Particularly Atherosclerosis and Alzheimer's Disease. *Exp Biol Med (Maywood)* **232**: pp 323-335.
- Brigstock DR (1999) The Connective Tissue Growth Factor/Cysteine-Rich 61/Nephroblastoma Overexpressed (CCN) Family. *Endocr Rev* **20**: pp 189-206.
- Broccoli D, Miller O J and Miller D A (1992) Isolation and Characterization of a Mouse Subtelomeric Sequence. *Chromosoma* **101**: pp 442-447.
- Brown DR, Nicholas R S and Canevari L (2002) Lack of Prion Protein Expression Results in a Neuronal Phenotype Sensitive to Stress. *J Neurosci Res* **67**: pp 211-224.
- Cartwright P, Muller H, Wagener C, Holm K and Helin K (1998) E2F-6: a Novel Member of the E2F Family Is an Inhibitor of E2F-Dependent Transcription. *Oncogene* **17**: pp 611-623.



- Chainiaux F, Magalhaes J P, Eliaers F, Remacle J and Toussaint O (2002) UVB-Induced Premature Senescence of Human Diploid Skin Fibroblasts. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: pp 1331-1339.
- Chan TH and Ward S (1993) Coping Process Theory: a Tool to Reduce Stress and Cardiovascular Disease. *AAOHN J* **41**: pp 499-503.
- Chistiakova OV (2008) [Signal Pathway of Insulin and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) As a Potential Regulator of Lifespan]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* **44**: pp 3-11.
- Chong L, van Steensel B, Broccoli D, Erdjument-Bromage H, Hanish J, Tempst P and de Lange T (1995) A Human Telomeric Protein. *Science* **270**: pp 1663-1667.
- Cristofalo VJ and Tresini M (1998) Defects in Signal Transduction During Replicative Senescence of Diploid Human Fibroblasts in Vitro. *Aging (Milano)* **10**: pp 151-152.
- Csikasz-Nagy A, Novak B and Tyson J J (2008) Reverse Engineering Models of Cell Cycle Regulation. *Adv Exp Med Biol* **641**: pp 88-97.
- Culotta VC, Klomp L W, Strain J, Casareno R L, Krems B and Gitlin J D (1997) The Copper Chaperone for Superoxide Dismutase. *J Biol Chem* **272**: pp 23469-23472.
- Culotta VC, Lin S J, Schmidt P, Klomp L W, Casareno R L and Gitlin J (1999) Intracellular Pathways of Copper Trafficking in Yeast and Humans. *Adv Exp Med Biol* **448**: pp 247-254.
- Dallaire F, Dupuis S, Fiset S and Chabot B (2000) Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1 and UP1 Protect Mammalian Telomeric Repeats and Modulate Telomere Replication in Vitro. *J Biol Chem* **275**: pp 14509-14516.
- de Magalhaes JP, Chainiaux F, de Longueville F, Mainfroid V, Migeot V, Marcq L, Remacle J, Salmon M and Toussaint O (2004) Gene Expression and Regulation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Premature Senescence of Human Foreskin Fibroblasts Expressing or Not Telomerase. *Exp Gerontol* **39**: pp 1379-1389.
- de Silva HV, Stuart W D, Park Y B, Mao S J, Gil C M, Wetterau J R, Busch S J and Harmony J A (1990) Purification and Characterization of Apolipoprotein J. *J Biol Chem* **265**: pp 14292-14297.
- Debacq-Chainiaux F, Borlon C, Pascal T, Royer V, Eliaers F, Ninane N, Carrard G, Friguet B, de Longueville F, Boffe S, Remacle J and Toussaint O (2005) Repeated Exposure of Human Skin Fibroblasts to UVB at Subcytotoxic Level Triggers Premature Senescence Through the TGF- $\beta$ 1 Signaling Pathway. *J Cell Sci* **118**: pp 743-758.
- Debacq-Chainiaux F, Pascal T, Boilan E, Bastin C, Bauwens E and Toussaint O (2008) Screening of Senescence-Associated Genes With Specific DNA Array Reveals the Role of IGFBP-3 in Premature Senescence of Human Diploid Fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **44**: pp 1817-1832.
- Desai V and Kaler S G (2008) Role of Copper in Human Neurological Disorders. *Am J Clin Nutr* **88**: pp 855S-858S.



- Dierick JF, Kalume D E, Wenders F, Salmon M, Dieu M, Raes M, Roepstorff P and Toussaint O (2002) Identification of 30 Protein Species Involved in Replicative Senescence and Stress-Induced Premature Senescence. *FEBS Lett* **531**: pp 499-504.
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano E E, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O and . (1995) A Biomarker That Identifies Senescent Human Cells in Culture and in Aging Skin in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: pp 9363-9367.
- Dumont P, Burton M, Chen Q M, Gonos E S, Fripiat C, Mazarati J B, Eliaers F, Remacle J and Toussaint O (2000) Induction of Replicative Senescence Biomarkers by Sublethal Oxidative Stresses in Normal Human Fibroblast. *Free Radic Biol Med* **28**: pp 361-373.
- Ebadi M, Sharma S K, Ghafourifar P, Brown-Borg H and El Refaey H (2005) Peroxynitrite in the Pathogenesis of Parkinson's Disease and the Neuroprotective Role of Metallothioneins. *Methods Enzymol* **396**: pp 276-298.
- Erickson S, Sangfelt O, Heyman M, Castro J, Einhorn S and Grandt D (1998) Involvement of the Ink4 Proteins P16 and P15 in T-Lymphocyte Senescence. *Oncogene* **17**: pp 595-602.
- Fahn HJ, Wang L S, Hsieh R H, Chang S C, Kao S H, Huang M H and Wei Y H (1996) Age-Related 4,977 Bp Deletion in Human Lung Mitochondrial DNA. *Am J Respir Crit Care Med* **154**: pp 1141-1145.
- Fan WH, Pech M and Karnovsky M J (2000) Connective Tissue Growth Factor (CTGF) Stimulates Vascular Smooth Muscle Cell Growth and Migration in Vitro. *Eur J Cell Biol* **79**: pp 915-923.
- Field LS, Luk E and Culotta V C (2002) Copper Chaperones: Personal Escorts for Metal Ions. *J Bioenerg Biomembr* **34**: pp 373-379.
- Filser N, Margue C and Richter C (1997) Quantification of Wild-Type Mitochondrial DNA and Its 4.8-Kb Deletion in Rat Organs. *Biochem Biophys Res Commun* **233**: pp 102-107.
- French LE, Wohlwend A, Sappino A P, Tschopp J and Schifferli J A (1994) Human Clusterin Gene Expression Is Confined to Surviving Cells During in Vitro Programmed Cell Death. *J Clin Invest* **93**: pp 877-884.
- Fripiat C, Chen Q M, Zdanov S, Magalhaes J P, Remacle J and Toussaint O (2001a) Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stress Triggers a Release of Transforming Growth Factor-Beta 1, Which Induces Biomarkers of Cellular Senescence of Human Diploid Fibroblasts. *J Biol Chem* **276**: pp 2531-2537.
- Fripiat C, Chen Q M, Zdanov S, Magalhaes J P, Remacle J and Toussaint O (2001b) Subcytotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stress Triggers a Release of Transforming Growth Factor-Beta 1, Which Induces Biomarkers of Cellular Senescence of Human Diploid Fibroblasts. *J Biol Chem* **276**: pp 2531-2537.
- Fripiat C, Dewelle J, Remacle J and Toussaint O (2002) Signal Transduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Senescence-Like Phenotype in Human Diploid Fibroblasts. *Free Radic Biol Med* **33**: pp 1334-1346.



- Garrick MD, Nunez M T, Olivares M and Harris E D (2003) Parallels and Contrasts Between Iron and Copper Metabolism. *Biometals* **16**: pp 1-8.
- Gerland LM, Peyrol S, Lallemant C, Branche R, Magaud J P and Ffrench M (2003) Association of Increased Autophagic Inclusions Labeled for Beta-Galactosidase With Fibroblastic Aging. *Exp Gerontol* **38**: pp 887-895.
- Gitlin JD (2003) Wilson Disease. *Gastroenterology* **125**: pp 1868-1877.
- Glerum DM, Shtanko A and Tzagoloff A (1996) Characterization of COX17, a Yeast Gene Involved in Copper Metabolism and Assembly of Cytochrome Oxidase. *J Biol Chem* **271**: pp 14504-14509.
- Gonos ES, Derventzi A, Kveiborg M, Agiostratidou G, Kassem M, Clark B F, Jat P S and Rattan S I (1998) Cloning and Identification of Genes That Associate With Mammalian Replicative Senescence. *Exp Cell Res* **240**: pp 66-74.
- Goodman VL, Brewer G J and Merajver S D (2004) Copper Deficiency As an Anti-Cancer Strategy. *Endocr Relat Cancer* **11**: pp 255-263.
- Gupta RS, Golding G B and Singh B (1994) HSP70 Phylogeny and the Relationship Between Archaeobacteria, Eubacteria, and Eukaryotes. *J Mol Evol* **39**: pp 537-540.
- Gutteridge JM (1985) Copper Can Both Mediate and Prevent Oxidative Damage. *Med Biol* **63**: pp 41-42.
- Gybina AA and Prohaska J R (2003) Increased Rat Brain Cytochrome c Correlates With Degree of Perinatal Copper Deficiency Rather Than Apoptosis. *J Nutr* **133**: pp 3361-3368.
- Halliwell B and Gutteridge J M (1984a) Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochem J* **219**: pp 1-14.
- Halliwell B and Gutteridge J M (1984b) Role of Iron in Oxygen Radical Reactions. *Methods Enzymol* **105**: pp 47-56.
- Hampel B, Wagner M, Teis D, Zwerschke W, Huber L A and Jansen-Durr P (2005) Apoptosis Resistance of Senescent Human Fibroblasts Is Correlated With the Absence of Nuclear IGFBP-3. *Aging Cell* **4**: pp 325-330.
- Harris ED (1993) The Transport of Copper. *Prog Clin Biol Res* **380**: pp 163-179.
- Harrison MD, Jones C E, Solioz M and Dameron C T (2000) Intracellular Copper Routing: the Role of Copper Chaperones. *Trends Biochem Sci* **25**: pp 29-32.
- HAYFLICK L and MOORHEAD P S (1961) The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* **25**: pp 585-621.
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N and Kretschmar H (1999) Evidence of Presynaptic Location and Function of the Prion Protein. *J Neurosci* **19**: pp 8866-8875.



Hinkal G and Donehower L A (2008) How Does Suppression of IGF-1 Signaling by DNA Damage Affect Aging and Longevity? *Mech Ageing Dev* **129**: pp 243-253.

Humphreys D, Hochgrebe T T, Easterbrook-Smith S B, Tenniswood M P and Wilson M R (1997) Effects of Clusterin Overexpression on TNFalpha- and TGFbeta-Mediated Death of L929 Cells. *Biochemistry* **36**: pp 15233-15243.

Inoue M, Sato E F, Nishikawa M, Park A M, Kira Y, Imada I and Utsumi K (2003) Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and Its Role in Aerobic Life. *Curr Med Chem* **10**: pp 2495-2505.

Itoh S, Kim H W, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner S M, Aoki H, Akram K, McKinney R D, Ushio-Fukai M and Fukai T (2008) Novel Role of Antioxidant-1 (Atox1) As a Copper-Dependent Transcription Factor Involved in Cell Proliferation. *J Biol Chem* **283**: pp 9157-9167.

Jeon KI, Jeong J Y and Jue D M (2000) Thiol-Reactive Metal Compounds Inhibit NF-Kappa B Activation by Blocking I Kappa B Kinase. *J Immunol* **164**: pp 5981-5989.

Joseph JA, Denisova N, Villalobos-Molina R, Erat S and Strain J (1996) Oxidative Stress and Age-Related Neuronal Deficits. *Mol Chem Neuropathol* **28**: pp 35-40.

Kamanga-Sollo E, Pampusch M S, White M E and Dayton W R (2003) Role of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein (IGFBP)-3 in TGF-Beta- and GDF-8 (Myostatin)-Induced Suppression of Proliferation in Porcine Embryonic Myogenic Cell Cultures. *J Cell Physiol* **197**: pp 225-231.

Kelner GS, Lee M, Clark M E, Maciejewski D, McGrath D, Rabizadeh S, Lyons T, Bredesen D, Jenner P and Maki R A (2000) The Copper Transport Protein Atox1 Promotes Neuronal Survival. *J Biol Chem* **275**: pp 580-584.

Kim KH, Park G T, Lim Y B, Rue S W, Jung J C, Sonn J K, Bae Y S, Park J W and Lee Y S (2004) Expression of Connective Tissue Growth Factor, a Biomarker in Senescence of Human Diploid Fibroblasts, Is Up-Regulated by a Transforming Growth Factor-Beta-Mediated Signaling Pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **318**: pp 819-825.

Kitagawa M, Higashi H, Suzuki-Takahashi I, Segawa K, Hanks S K, Taya Y, Nishimura S and Okuyama A (1995) Phosphorylation of E2F-1 by Cyclin A-Cdk2. *Oncogene* **10**: pp 229-236.

Klomp LW, Lin S J, Yuan D S, Klausner R D, Culotta V C and Gitlin J D (1997) Identification and Functional Expression of HAH1, a Novel Human Gene Involved in Copper Homeostasis. *J Biol Chem* **272**: pp 9221-9226.

Ksiazek K, Mikula-Pietrasik J, Jorres A and Witowski J (2008) Oxidative Stress-Mediated Early Senescence Contributes to the Short Replicative Life Span of Human Peritoneal Mesothelial Cells. *Free Radic Biol Med* **45**: pp 460-467.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y and Erusalimsky J D (2000) Senescence-Associated (Beta)-Galactosidase Reflects an Increase in Lysosomal Mass During Replicative Ageing of Human Endothelial Cells. *J Cell Sci* **113** ( Pt 20): pp 3613-3622.



- Kveiborg M, Flyvbjerg A, Eriksen E F and Kassem M (2001) Transforming Growth Factor-Beta1 Stimulates the Production of Insulin-Like Growth Factor-I and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 in Human Bone Marrow Stromal Osteoblast Progenitors. *J Endocrinol* **169**: pp 549-561.
- Landis GN and Tower J (2005) Superoxide Dismutase Evolution and Life Span Regulation. *Mech Ageing Dev* **126**: pp 365-379.
- Lee BY, Han J A, Im J S, Morrone A, Johung K, Goodwin E C, Kleijer W J, DiMaio D and Hwang E S (2006) Senescence-Associated Beta-Galactosidase Is Lysosomal Beta-Galactosidase. *Aging Cell* **5**: pp 187-195.
- Lee J, Prohaska J R, Dagenais S L, Glover T W and Thiele D J (2000) Isolation of a Murine Copper Transporter Gene, Tissue Specific Expression and Functional Complementation of a Yeast Copper Transport Mutant. *Gene* **254**: pp 87-96.
- Lee J, Prohaska J R and Thiele D J (2001) Essential Role for Mammalian Copper Transporter Ctr1 in Copper Homeostasis and Embryonic Development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: pp 6842-6847.
- Li YH, Wang B D and Yang Z Y (2007) Infrared and DNA-Binding on Ultraviolet and Fluorescence Spectra of New Copper and Zinc Complexes With a Naringenin Schiff-Base Ligand. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **67**: pp 395-401.
- Lin SJ and Culotta V C (1995) The ATX1 Gene of *Saccharomyces Cerevisiae* Encodes a Small Metal Homeostasis Factor That Protects Cells Against Reactive Oxygen Toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: pp 3784-3788.
- Lin SJ, Pufahl R A, Dancis A, O'Halloran T V and Culotta V C (1997) A Role for the *Saccharomyces Cerevisiae* ATX1 Gene in Copper Trafficking and Iron Transport. *J Biol Chem* **272**: pp 9215-9220.
- Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R and Lomeli N (1998) Copper Transport. *Am J Clin Nutr* **67**: pp 965S-971S.
- Lindquist S and Craig E A (1988) The Heat-Shock Proteins. *Annu Rev Genet* **22**: pp 631-677.
- Liu VW, Zhang C and Nagley P (1998) Mutations in Mitochondrial DNA Accumulate Differentially in Three Different Human Tissues During Ageing. *Nucleic Acids Res* **26**: pp 1268-1275.
- Lohr M, Schmidt C, Ringel J, Kluth M, Muller P, Nizze H and Jesnowski R (2001) Transforming Growth Factor-Beta1 Induces Desmoplasia in an Experimental Model of Human Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res* **61**: pp 550-555.
- Lu T and Finkel T (2008) Free Radicals and Senescence. *Exp Cell Res* **314**: pp 1918-1922.
- Madsen E and Gitlin J D (2007) Copper Deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* **23**: pp 187-192.
- Mansouri A, Gaou I, Fromenty B, Berson A, Letteron P, Degott C, Erlinger S and Pessayre D (1997) Premature Oxidative Aging of Hepatic Mitochondrial DNA in Wilson's Disease. *Gastroenterology* **113**: pp 599-605.



Martin JL and Baxter R C (1991) Transforming Growth Factor-Beta Stimulates Production of Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 by Human Skin Fibroblasts. *Endocrinology* **128**: pp 1425-1433.

Martin MP, Dean M, Smith M W, Winkler C, Gerrard B, Michael N L, Lee B, Doms R W, Margolick J, Buchbinder S, Goedert J J, O'Brien T R, Hilgartner M W, Vlahov D, O'Brien S J and Carrington M (1998) Genetic Acceleration of AIDS Progression by a Promoter Variant of CCR5. *Science* **282**: pp 1907-1911.

Maryon EB, Molloy S A, Zimnicka A M and Kaplan J H (2007) Copper Entry into Human Cells: Progress and Unanswered Questions. *Biometals* **20**: pp 355-364.

Massague J and Wotton D (2000) Transcriptional Control by the TGF-Beta/Smad Signaling System. *EMBO J* **19**: pp 1745-1754.

Meissner C, Mohamed S A, von Wurmb N and Oehmichen M (2001) [The Mitochondrial Genome and Aging]. *Z Gerontol Geriatr* **34**: pp 447-451.

Mendelsohn BA, Yin C, Johnson S L, Wilm T P, Solnica-Krezel L and Gitlin J D (2006) Atp7a Determines a Hierarchy of Copper Metabolism Essential for Notochord Development. *Cell Metab* **4**: pp 155-162.

Mercer JF (2001) The Molecular Basis of Copper-Transport Diseases. *Trends Mol Med* **7**: pp 64-69.

Meyne J, Ratliff R L and Moyzis R K (1989) Conservation of the Human Telomere Sequence (TTAGGG)<sub>n</sub> Among Vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: pp 7049-7053.

Michel D, Chatelain G, North S and Brun G (1997) Stress-Induced Transcription of the Clusterin/ApoJ Gene. *Biochem J* **328** ( Pt 1): pp 45-50.

Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Muzzioli M, Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Isani G, Zambenedetti P and Zatta P (2001) Zinc-Bound Metallothioneins As Potential Biological Markers of Ageing. *Brain Res Bull* **55**: pp 147-153.

Nelson TJ and Alkon D L (2005) Oxidation of Cholesterol by Amyloid Precursor Protein and Beta-Amyloid Peptide. *J Biol Chem* **280**: pp 7377-7387.

Nose Y, Rees E M and Thiele D J (2006) Structure of the Ctr1 Copper Trans'PORE'Ter Reveals Novel Architecture. *Trends Biochem Sci* **31**: pp 604-607.

Orhan G, Yapici N, Yuksel M, Sargin M, Senay S, Yalcin A S, Aykac Z and Aka S A (2006) Effects of N-Acetylcysteine on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Bypass Surgery. *Heart Vessels* **21**: pp 42-47.

Otterbein LE and Choi A M (2000) Heme Oxygenase: Colors of Defense Against Cellular Stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: pp L1029-L1037.

Pang CY, Lee H C, Yang J H and Wei Y H (1994) Human Skin Mitochondrial DNA Deletions Associated With Light Exposure. *Arch Biochem Biophys* **312**: pp 534-538.



Pardee AB (1974) A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: pp 1286-1290.

Parsell DA and Lindquist S (1993) The Function of Heat-Shock Proteins in Stress Tolerance: Degradation and Reactivation of Damaged Proteins. *Annu Rev Genet* **27**: pp 437-496.

Pascal T, Debaq-Chainiaux F, Boilan E, Ninane N, Raes M and Toussaint O (2007) Heme Oxygenase-1 and Interleukin-11 Are Overexpressed in Stress-Induced Premature Senescence of Human WI-38 Fibroblasts Induced by Tert-Butylhydroperoxide and Ethanol. *Biogerontology* **8**: pp 409-422.

Pascal T, Debaq-Chainiaux F, Chretien A, Bastin C, Dabee A F, Bertholet V, Remacle J and Toussaint O (2005) Comparison of Replicative Senescence and Stress-Induced Premature Senescence Combining Differential Display and Low-Density DNA Arrays. *FEBS Lett* **579**: pp 3651-3659.

Passarella S, de Bari L, Valenti D, Pizzuto R, Paventi G and Atlante A (2008) Mitochondria and L-Lactate Metabolism. *FEBS Lett* **582**: pp 3569-3576.

Pena MM, Lee J and Thiele D J (1999) A Delicate Balance: Homeostatic Control of Copper Uptake and Distribution. *J Nutr* **129**: pp 1251-1260.

Puig S and Thiele D J (2002) Molecular Mechanisms of Copper Uptake and Distribution. *Curr Opin Chem Biol* **6**: pp 171-180.

Rodriguez H and Akman S A (1998) Mapping Oxidative DNA Damage at Nucleotide Level. *Free Radic Res* **29**: pp 499-510.

Ryter SW, Otterbein L E, Morse D and Choi A M (2002) Heme Oxygenase/Carbon Monoxide Signaling Pathways: Regulation and Functional Significance. *Mol Cell Biochem* **234-235**: pp 249-263.

Sen CK, Khanna S, Venojarvi M, Trikha P, Ellison E C, Hunt T K and Roy S (2002) Copper-Induced Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Wound Healing. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **282**: pp H1821-H1827.

Sensibar JA, Sutkowski D M, Raffo A, Buttyan R, Griswold M D, Sylvester S R, Kozlowski J M and Lee C (1995) Prevention of Cell Death Induced by Tumor Necrosis Factor Alpha in LNCaP Cells by Overexpression of Sulfated Glycoprotein-2 (Clusterin). *Cancer Res* **55**: pp 2431-2437.

Seok SH, Park J H, Baek M W, Lee H Y, Kim D J, Uhm H M, Hong J J, Na Y R, Jin B H, Ryu D Y and Park J H (2006) Specific Activation of the Human HSP70 Promoter by Copper Sulfate in Mosaic Transgenic Zebrafish. *J Biotechnol* **126**: pp 406-413.

Shay JW and Wright W E (2000) Hayflick, His Limit, and Cellular Ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**: pp 72-76.

Sherr CJ and Roberts J M (1999) CDK Inhibitors: Positive and Negative Regulators of G1-Phase Progression. *Genes Dev* **13**: pp 1501-1512.



- Shi XL and Dalal N S (1992) The Role of Superoxide Radical in Chromium (VI)-Generated Hydroxyl Radical: the Cr(VI) Haber-Weiss Cycle. *Arch Biochem Biophys* **292**: pp 323-327.
- Simmons Kovacs LA, Orlando D A and Haase S B (2008) Transcription Networks and Cyclin/CDKs: the Yin and Yang of Cell Cycle Oscillators. *Cell Cycle* **7**: pp 2626-2629.
- Sintich SM, Steinberg J, Kozlowski J M, Lee C, Pruden S, Sayeed S and Sensibar J A (1999) Cytotoxic Sensitivity to Tumor Necrosis Factor-Alpha in PC3 and LNCaP Prostatic Cancer Cells Is Regulated by Extracellular Levels of SGP-2 (Clusterin). *Prostate* **39**: pp 87-93.
- Slebos DJ, Ryter S W and Choi A M (2003) Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in Pulmonary Medicine. *Respir Res* **4**: pp 7.
- Song MO and Freedman J H (2005) Expression of Copper-Responsive Genes in HepG2 Cells. *Mol Cell Biochem* **279**: pp 141-147.
- Strausak D, Mercer J F, Dieter H H, Stremmel W and Multhaup G (2001) Copper in Disorders With Neurological Symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson Diseases. *Brain Res Bull* **55**: pp 175-185.
- Strozyk D, Launer L J, Adlard P A, Cherny R A, Tsatsanis A, Volitakis I, Blennow K, Petrovitch H, White L R and Bush A I (2007) Zinc and Copper Modulate Alzheimer Abeta Levels in Human Cerebrospinal Fluid. *Neurobiol Aging*.
- Tao TY and Gitlin J D (2003) Hepatic Copper Metabolism: Insights From Genetic Disease. *Hepatology* **37**: pp 1241-1247.
- Tennant J, Stansfield M, Yamaji S, Srai S K and Sharp P (2002) Effects of Copper on the Expression of Metal Transporters in Human Intestinal Caco-2 Cells. *FEBS Lett* **527**: pp 239-244.
- Tesco G, Vergelli M, Grassilli E, Salomoni P, Bellesia E, Sikora E, Radziszewska E, Barbieri D, Latorraca S, Fagiolo U, Santacaterina S, Amaducci L, Tiozzo R, Franceschi C and Sorbi S (1998) Growth Properties and Growth Factor Responsiveness in Skin Fibroblasts From Centenarians. *Biochem Biophys Res Commun* **244**: pp 912-916.
- Toussaint O, Houbion A and Remacle J (1992) Aging As a Multi-Step Process Characterized by a Lowering of Entropy Production Leading the Cell to a Sequence of Defined Stages. II. Testing Some Predictions on Aging Human Fibroblasts in Culture. *Mech Ageing Dev* **65**: pp 65-83.
- Toussaint O, Royer V, Salmon M and Remacle J (2002) Stress-Induced Premature Senescence and Tissue Ageing. *Biochem Pharmacol* **64**: pp 1007-1009.
- Turnlund JR, Scott K C, Peiffer G L, Jang A M, Keyes W R, Keen C L and Sakanashi T M (1997) Copper Status of Young Men Consuming a Low-Copper Diet. *Am J Clin Nutr* **65**: pp 72-78.
- Turnlund JR, Weaver C M, Kim S K, Keyes W R, Gizaw Y, Thompson K H and Peiffer G L (1999) Molybdenum Absorption and Utilization in Humans From Soy and Kale Intrinsically Labeled With Stable Isotopes of Molybdenum. *Am J Clin Nutr* **69**: pp 1217-1223.



- Uauy R, Olivares M and Gonzalez M (1998) Essentiality of Copper in Humans. *Am J Clin Nutr* **67**: pp 952S-959S.
- Valentine JS and Gralla E B (1997) Delivering Copper Inside Yeast and Human Cells. *Science* **278**: pp 817-818.
- Varela-Nallar L, Toledo E M, Larrondo L F, Cabral A L, Martins V R and Inestrosa N C (2006) Induction of Cellular Prion Protein Gene Expression by Copper in Neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: pp C271-C281.
- Waggoner DJ, Bartnikas T B and Gitlin J D (1999) The Role of Copper in Neurodegenerative Disease. *Neurobiol Dis* **6**: pp 221-230.
- Watt NT, Routledge M N, Wild C P and Hooper N M (2007) Cellular Prion Protein Protects Against Reactive-Oxygen-Species-Induced DNA Damage. *Free Radic Biol Med* **43**: pp 959-967.
- Weebadda WK, Jackson T J and Lin A W (2005) Expression of P16INK4A Variants in Senescent Human Fibroblasts Independent of Protein Phosphorylation. *J Cell Biochem* **94**: pp 1135-1147.
- White AR, Multhaup G, Galatis D, McKinstry W J, Parker M W, Pipkorn R, Beyreuther K, Masters C L and Cappai R (2002) Contrasting, Species-Dependent Modulation of Copper-Mediated Neurotoxicity by the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein. *J Neurosci* **22**: pp 365-376.
- Wirth D, Christians E, Munaut C, Dessy C, Foidart J M and Gustin P (2002) Differential Heat Shock Gene Hsp70-1 Response to Toxicants Revealed by in Vivo Study of Lungs in Transgenic Mice. *Cell Stress Chaperones* **7**: pp 387-395.
- Wurm S and Wechselberger C (2006) Prion Protein Modifies TGF-Beta Induced Signal Transduction. *Biochem Biophys Res Commun* **349**: pp 525-532.
- Zakeri Z, Curto M, Hoover D, Wightman K, Engelhardt J, Smith F F, Kierszenbaum A L, Gleeson T and Tenniswood M (1992) Developmental Expression of the S35-S45/SGP-2/TRPM-2 Gene in Rat Testis and Epididymis. *Mol Reprod Dev* **33**: pp 373-384.
- Zatta P, Drago D, Zambenedetti P, Bolognin S, Nogara E, Peruffo A and Cozzi B (2008a) Accumulation of Copper and Other Metal Ions, and Metallothionein I/II Expression in the Bovine Brain As a Function of Aging. *J Chem Neuroanat*.
- Zatta P, Drago D, Zambenedetti P, Bolognin S, Nogara E, Peruffo A and Cozzi B (2008b) Accumulation of Copper and Other Metal Ions, and Metallothionein I/II Expression in the Bovine Brain As a Function of Aging. *J Chem Neuroanat* **36**: pp 1-5.
- Zhou B and Gitschier J (1997) HCTR1: a Human Gene for Copper Uptake Identified by Complementation in Yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: pp 7481-7486.
- Zhu Z and Thiele D J (1996) Toxic Metal-Responsive Gene Transcription. *EXS* **77**: pp 307-320.



# Table des matières

## Introduction

---

### Partie 1 : Mécanismes de la sénescence répllicative et de la sénescence induite prématurément par les stress

1. Sénescence Répllicative .....	- 1 -
2. Sénescence Induite Prématurément par les stress (SIPS).....	- 1 -
3. Les biomarqueurs de la sénescence.....	- 2 -
3.1. Modification histochimique : activité $\beta$ -galactosidase associé à la sénescence.....	- 2 -
3.2. Altération de l'ADN mitochondrial .....	- 2 -
3.3. Raccourcissement des télomères .....	- 3 -
3.4. Régulation du cycle cellulaire .....	- 4 -
3.4.1. Les gènes de réponse précoce .....	- 4 -
3.4.2. Les gènes de la phase G1/S .....	- 5 -
3.4.3. Les CDK/cyclines .....	- 5 -
3.4.4. Les inhibiteurs des complexes cycline/CDK .....	- 6 -
3.5. Expression de gènes associés à la sénescence.....	- 6 -

### Partie 2 : Cuivre et vieillissement cellulaire

1. Cuivre : Généralités.....	- 9 -
2. Métabolisme lié au cuivre .....	- 9 -
3. Propriétés antioxydantes et pro-oxydantes du cuivre.....	- 11 -
4. Implication du cuivre dans diverses pathologies liées au vieillissement .....	- 13 -
5. Implication du cuivre dans la sénescence .....	- 15 -

## But du mémoire

---

Objectifs du mémoire.....	-17-
---------------------------	------

## Matériel et méthode

---

1. Culture Cellulaire .....	- 18 -
1.1. Matériel .....	- 18 -
1.2. Méthode.....	- 18 -
2. Exposition des fibroblastes WI-38 au sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ) .....	- 18 -
3. Sénescence induite prématurément par l' $\text{H}_2\text{O}_2$ .....	- 18 -



4.	Stimulation des fibroblastes WI-38 avec du TGFβ-1 .....	19 -
5.	Incubation des fibroblastes WI-38 avec un anticorps neutralisant le TGFB-1 .....	19 -
6.	Détermination de la viabilité cellulaire par la méthode du MTT .....	19 -
6.1.	Principe.....	19 -
6.2.	Matériel .....	19 -
6.3.	Méthode.....	19 -
7.	Activité β-galactosidase associé à la sénescence .....	20 -
7.1.	Matériel .....	20 -
7.2.	Méthode.....	20 -
8.	Incorporation de la Thymidine Tritiée .....	20 -
8.1.	Matériel .....	20 -
8.2.	Méthode.....	20 -
9.	Dosage protéique par la méthode de Folin.....	21 -
9.1.	Matériel .....	21 -
9.2.	Méthode.....	21 -
10.	Extraction protéique totale .....	21 -
10.1.	Matériel .....	21 -
10.2.	Méthode.....	21 -
11.	Dosage des échantillons protéiques par la méthode de Bradford.....	22 -
11.1.	Matériel .....	22 -
11.2.	Méthode.....	22 -
12.	Western Blotting .....	22 -
12.1.	Principe.....	22 -
12.2.	Préparation des échantillons dans des microtubes .....	23 -
12.3.	Migration : Gels Tris-Glycine .....	23 -
12.4.	Transfert .....	23 -
12.5.	Traitement de la membrane et révélation .....	24 -
13.	Marquage en Immunofluorescence .....	24 -
13.1.	Principe.....	24 -
14.	Extraction d'ARN total .....	25 -
14.1.	Matériel .....	25 -
14.2.	Méthode.....	25 -
15.	Transcription inverse.....	26 -
15.1.	Principe.....	26 -
15.2.	Matériel .....	26 -
15.3.	Méthode.....	26 -
16.	PCR en temps réel.....	27 -
16.1.	Principe.....	27 -
16.2.	Matériel .....	27 -



16.3.	Méthode.....	27 -
17.	Mise en évidence de stress oxydatifs .....	28 -
17.1.	Incubation des cellules WI-38 avec la sonde DCF .....	28 -
17.2.	Incubation des cellules WI-38 au Trolox .....	28 -

## Résultats et Discussion

---

1.	Mise au point d'un modèle d'exposition des fibroblastes WI-38 au sulfate de cuivre, CuSO <sub>4</sub> .....	29 -
2.	Effets de l'exposition de fibroblastes WI-38 au CuSO <sub>4</sub> .....	30 -
2.1.	Etude des variations d'abondance relative en ARNm de gènes régulés par le cuivre-30 -	
2.2.	Etude des variations d'abondance des protéines Hsp70 et Hmox-1 .....	31 -
2.3.	Conclusions .....	33 -
3.	Expression des gènes MT2A, Prp, Hmox-1 et Hsp70 lors de la sénescence induite prématurément par l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	34 -
4.	Etude des biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO <sub>4</sub> .....	35 -
5.	Implication de la voie du TGFβ-1 dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après exposition au CuSO <sub>4</sub> .....	37 -
5.1.	Etude de l'expression de MT2A, Prp, Hmox-1 et Hsp70 après stimulation des fibroblastes WI-38 avec le TGFβ-1 .....	37 -
5.2.	Abondance relative de Hsp70 et Hmox-1 après incubation des fibroblastes WI-38 avec un anticorps neutralisant le TGFβ-1 en présence de CuSO <sub>4</sub> .....	38 -
5.3.	Conclusions .....	38 -
6.	Causes potentielles de l'apparition de biomarqueurs de la sénescence suite à l'exposition de fibroblastes WI-38 au CuSO <sub>4</sub> .....	38 -
6.1.	Production radicalaire suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO <sub>4</sub> .....	39 -
6.2.	Evaluation des dommages à l'ADN suite à l'exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO <sub>4</sub> -	40 -
6.3.	Conclusion.....	40 -

## Conclusions et perspectives

---

1.	Mise au point d'un modèle d'exposition des fibroblastes WI-38 au sulfate de cuivre, CuSO <sub>4</sub> .....	41 -
2.	Effets de l'exposition de fibroblastes WI-38 au CuSO <sub>4</sub> .....	41 -
3.	Expression des gènes codants pour MT2A, PrP, Hmox-1 et Hsp70 lors de la sénescence induite prématurément par l'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	42 -



4. Etude des biomarqueurs de la sénescence après exposition des fibroblastes WI-38 au CuSO <sub>4</sub> .....	- 43 -
5. Implication de la voie du TGFβ-1 dans l'apparition des biomarqueurs de la sénescence après exposition au CuSO <sub>4</sub> .....	- 44 -
6. Causes potentielles de l'apparition de biomarqueurs de la sénescence suite à l'exposition de fibroblastes WI-38 au CuSO <sub>4</sub> .....	- 44 -
7. Quelques perspectives générales .....	- 46 -

## Bibliographie

---

Liste de référence.....	-47-
-------------------------	------